

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS
FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DEL CACAO (*Theobroma cacao*) EN
EL SECTOR LOS LAURELES CANTON LA MANA- PERIODO 2015.**

Tesis de grado presentada como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

Oña Cuyachamin Nancy Jeaneth

DIRECTORA DE TESIS:

Ing. Guadalupe López. Mg.

Cotopaxi-Ecuador

2015

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, OÑA CUYACHAMIN NANCY JEANETH, con cédula de ciudadanía N° 050316898-1, actuando en calidad de autor de la tesis denominada **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DEL CACAO (*Theobroma cacao*) EN EL SECTOR LOS LAURELES CANTÓN LA MANÁ- PERÍODO 2015.**

Declaro que el contenido de la presente tesis, es original, auténtica y académica, así como sus comentarios y discusiones emitidas son de exclusiva responsabilidad del autor.

Oña Cuyachamin Nancy Jeaneth

C.I. 050316898-1

AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS

Cumpliendo lo estipulado en el capítulo v Art.12, literal f del reglamento del curso profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi en calidad de director de tema de tesis: “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DEL CACAO, (*Theobroma cacao*), EN EL SECTOR LOS LAURELES CANTÓN LA MANÁ- PERIODO 2015”, debo confirmar que el presente trabajo de investigación fue desarrollado de acuerdo con el planteamiento requerido.

En virtud ante lo expuesto considero que se encuentra habilitada para presentar al acto de defensa de Tesis la cual se encuentra abierta para posteriores investigaciones.

Ing. Guadalupe López Mg.
Directora de Tesis

AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

En calidad de miembros de miembros de tribunal de la tesis Titulada: “Caracterización morfológica de hongos Fitopatógenos en el cultivo de cacao en el sector los laureles del cantón la mana provincia de Cotopaxi- 2015, de autoría de la egresada Oña cuyachamin Nancy jeaneth CERTIFICAMOS que se ha realizado las respectivas revisiones correcciones y aprobaciones al presente documento.

Aprobado por:

Ing. Guadalupe López Mg.

Directora de Tesis

Ing. Karina Marín Mg.

PRESIDENTA

Ing. Luis Benavides

OPOSITOR

Ing. Santiago Jiménez

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Universidad
Técnica de
Cotopaxi



Centro
Cultural de
Idiomas

IDIOMAS

CENTRO CULTURAL DE

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de docente del idioma de Inglés de la Universidad de Cotopaxi: en forma legal CERTIFICO que la traducción del resumen de tesis al Idioma del Inglés presentando por la señor Egresado de la Carrera de Ing. Agronómica de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales: NANCY JEANETH OÑA CUYACHAMIN Cuyo título versa **CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE HONGOS FITOPATOGENOS EN EL CULTIVO DE CACAO** (*Theobroma cacao*) **EN EL SECTOR LOS LAURELES DEL CANTÓN LA MANA -COTOPAXI 2015**, lo realizo bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del idioma.

Es cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer el uso del presente certificado de manera ética que estimaren conveniente.

Latacunga, Enero,2016

Atentamente

.....

Wilmer Collaguazo

C.I:172241757-1

DOCENTE DEL CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS UTC.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por todas las bendiciones recibidas en todo momento y por estar a mi lado en cada paso de mi vida la cual me ayuda a salir adelante pese a grandes adversidades de la vida.

Agradezco a mi madre María y a toda mi familia por estar conmigo y apoyar incondicionalmente en todo momento y en todo lugar, gracias por estar conmigo mamita y por su gran ejemplo de esfuerzo y valentía.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi en especial a la Carrera de Ingeniería Agronómica quien me ha dado la gran oportunidad de educarme con sabiduría.

A los docentes de la Unidad Académica de Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales por su tiempo y dedicación para la buena educación.

Mi más sincero agradecimiento a la Ing. Guadalupe López Mg. Directora de tesis gracias por su paciencia y por la invaluable dirección técnica en el desarrollo de este trabajo de investigación.

A mis amigos y a todas las personas que colaboraron y confiaron en mí para culminar este trabajo de investigación.

Muchas Gracias.....

Nancy Oña C

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico con mucho cariño amor a Dios y a mi madre María Cuyachamín quien confió en mí desde el momento en que nací, y que ahora no está conmigo y desde el cielo me da sus bendiciones y deseos de salir adelante pese a grandes adversidades de la vida.

A mis hermanos, Francisco, Elena, Wilson, Néstor y a mis tíos Gregorio y Francisco. Por cultivar y mantener el respeto y la unión familiar con su comprensión y ayuda incondicional los que me han dado fuerza y voluntad para seguir adelante.

Muchas Gracias.....

Nancy Oña C.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO.....	VI
DEDICATORIA.....	VII
ÍNDICE GENERAL.....	VIII
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE IMÁGENES.....	X
RESUMEN	XI
ABSTRACTS.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	XIII
JUSTIFICACIÓN.....	1
OBJETIVOS	2
OBJETIVO GENERAL	2
OBJETIVO ESPECÍFICOS	2
PREGUNTA DIRECTRIZ	3
CAPITULO I.....	4
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	4
1.1. EL CULTIVO DEL CACAO (<i>Theobroma cacao</i>).....	4
1.1.1. Clasificación Botánica	6
1.1.2.1 La moniliasis del cacao.....	7
1.1.3 HONGOS FITOPATÓGENOS	12
2.CAPITULOII.....	24
2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	24
2.1.1. Recursos humanos.	24
2.1.2. Materiales de campo.....	24
2.1.4. Materiales Del Laboratorio	25
2.4.DISEÑO METODOLÓGICO... ..	29

2.4.1. Tipo de investigación.	29
2.5. Método.	30
2.5.1. Métodos lógicos	30
2.5.1.1. Descriptivo y exploratorio	30
2.7. TÉCNICA.	30
2.8. METODOLOGÍA.	30
2.8.1. Delimitación del lugar de recolección.	30
2.8.2. Diagnóstico del cultivo.	31
2.8.4. Toma de muestras.	31
2.8.5. Toma de muestras.	31
2.8.5.1. Procedimiento en la toma de muestras.	32
2.9 Laboratorio.	32
2.9.1 Aislamiento.	32
2.9.2 Purificación.	32
2.9.3 Inoculación.	33
CAPÍTULO III.	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1 Observación en Campo.	36
3.1. Hongo fitopatógeno de mayor impacto.	36
9 Signos y síntomas de la enfermedad moniliasis en campo.	38
3.3 Observación en laboratorio.	39
3.3. 1 Macro y microestructuras del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	39
3.3.2 Ciclo de vida de hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	45
Descripción del ciclo de vida del patógeno.	46
CONCLUSIONES	47
RECOMENDACIONES.	49
GLOSARIO DE TÉRMINOS.	50

Bibliografía	52
ANEXOS	54

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO :1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CACAO	6
CUADRO :2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA (<i>Moniliophthora roreri</i>)	7
CUADRO :3 COORDENADAS GEOGRÁFICAS	27
CUADRO: 4 UBICACIÓN POLÍTICA	28
CUADRO: 5 UBICACIÓN DEL LABORATORIO	28
CUADRO: 6 SIGNOS Y SÍNTOMAS (<i>Moniliophthora roreri</i>)	38

ÍNDICE DE IMÁGENES

1imagen:1 En campo del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	37
1imagen:2 Imágenes de signos y síntomas observados en campo	38
1imagen:3 Imágenes de signos y síntomas observados en campo	38
1imagen:4 Imágenes de signos y síntomas observados en campo	38
1imagen:5 Imágenes de signos y síntomas observados en campo	38
1imagen:6 Reproducción en laboratorio del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	39
1imagen:7 Reproducción en laboratorio del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	40
1imagen:8 Reproducción en laboratorio del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	41
1imagen:9 Reproducción en laboratorio del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	41
1imagen:10 Reproducción en laboratorio del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	42
1imagen:11 Reproducción en laboratorio del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	43
1imagen:12 Reproducción en laboratorio del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	43
1imagen:13 Reproducción en laboratorio del hongo (<i>Moniliophthora roreri</i>)	44

RESUMEN

A nivel mundial el cacao es una fruta tropical con gran impacto económico, el Ecuador es uno de los países que más aporta al mundo con un 63% de su producción, llegando a ser de esta manera uno de los productos que genera grandes divisas y recursos para el Ecuador. Este cultivo es afectado por varias enfermedades, pero una de las que mayor impacto económico ha causado es la moniliasis producido por el hongo *Moniliophthora roreri*. Motivo por la cual se planteó la siguiente investigación “Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*), en el Sector Los Laureles del Cantón La Maná. El mismo que se encuentra ubicado a una altura de 586 m.s.n.m con temperatura de 23 C° y humedad relativa de 92% con el objetivo de caracterizar morfológicamente al hongo fitopatógeno que causa mayor impacto económico. Para el desarrollo de esta investigación se visitó el lugar donde se tomó muestras de frutos infectados con características similares posteriormente se las etiquetó y se transportó al laboratorio. Dentro del laboratorio se elaboró el agar un tiempo lapso de tres horas, se tomó 3 mm de tejido enfermo, se desinfectó con una solución de cloro 2:1, posteriormente el tejido se inoculó en el medio de cultivo y se selló con papel parafilm. Para su incubación se requirió Temperatura de 24 C° y humedad relativa de 70% por un lapso de tres días. En conclusión durante el transcurso del desarrollo de la investigación se pudo observar el ciclo biológico del hongo que duró 72 horas, en las primeras 24 horas el hongo presentó micelio de color café, a las 48 horas presentó micelio de color blanquecino con conidióforos y a las 72 horas se pudo observar conidióforos con conidios reproductores de color gris y a través del microscopio se pudo identificar las estructuras del hongo que contenía: micelio alargado, conidióforos de 20 µm, conidios hilarios de 9-15 µm con esporas de 10-35 unidades de forma elipsoidal. Mediante los resultados obtenidos se pudo elaborar la guía didáctica como un manual de estudio para posteriores investigaciones.

ABTRACT

Worldwide cocoa is a tropical fruit with great economic impact, Ecuador is a country that contributes most to the world with 63% of its production becoming thus one of the products generated and resources for major currencies The equator. Similarly in Ecuador this crop is affected by various diseases, but one that has caused the greatest economic impact is caused by the fungus thrush ((*Moniliophthora roreri*) it has caused losses of 16-90% of production. Reason why this research was conducted in the Los Laureles Canton La Mana which is located at a height of 586 m with T ° of 23 ° C and 92% RH .For the development of this research visit the place where samples of infected fruits with similar characteristics took the etiquiti and subsequently transported to the laboratory within the laboratory for playback performed as follows:. The agar was prepared a three-hour time period, it took 3 mm diseased tissue was disinfected with chlorine solution. 2: 1, then inoculated into tissue culture medium and sealed with paper film was required for incubation of T ° 24 ° C with 70% RH for a period three days. During the course of the investigation it was observed that: the life cycle of the fungus through the stethoscope as the fungus structure containing: elongated mycelium, conidiophores of 20 microns, 9-15 microns hilianos conidia spores 10-35 units of ellipsoidal shape.

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, el cacao se caracteriza por ser uno de los productos más importantes cultivados en todo el país, es un producto indispensable para la alimentación humana, y gran parte es utilizado en procesos agroindustriales en casi todas las regiones del país, por lo es conocida como la “pepa de oro”.

De la misma manera en el Ecuador son varias las enfermedades que atacan al cultivo del cacao (*Theobroma cacao*) y una de las que presentan mayor impacto económico que causa grandes bajas y pérdidas de un, 16 - 90%, es la moniliasis causada por el hongo *Moniliophthora roreri*. (ÁRTICA, 2008).

Esta enfermedad fue estudiada por el científico J. B. RORER. En 1914 fue detectada en la región de Quevedo en Ecuador, por esto también es conocida como pudrición acuosa, helada, mancha ceniza o enfermedad de Quevedo, está causado por el hongo (*Moniliophthora roreri*) el mismo que se ha diseminado paulatinamente hacia el sur del Perú al norte a las áreas productoras de cacao en Colombia hasta las embocaduras del Amazonas luego a toda la zona latinoamericana. (J.BRAUDEAU, 2008).

La severidad del ataque de esta enfermedad depende de las condiciones climáticas o microclimas de cada una de las regiones esta enfermedad es tan severa que pasa a formar uno de los factores limitantes causando grandes pérdidas económicas con tan solo afectar a las mazorcas. (ÁRTICA, 2008).

Se dice que en Ecuador y Colombia esta enfermedad ataca a la producción de un 16-80% con un promedio que varían de 20 al 22%.

Los síntomas de esta enfermedad se presentan con una maduración prematura marchitez y secamiento de los frutos dando como resultados grandes pérdidas económicas para las familias ecuatorianas.

JUSTIFICACIÓN

El Ecuador se caracteriza por ser uno de los países con mayor producción del cacao, ya que este es un producto indispensable para la alimentación humana, y gran parte es utilizado en procesos agroindustriales en casi todas las regiones del país, por lo es conocida como la “Pepa de oro”.

En Ecuador la superficie cultivada de cacao (*Theobroma cacao*) es de 500.000 hectáreas, su producción se va incrementándose debido a que existe una mayor demanda con el paso del tiempo Ecuador es el sexto productor de este grano en el mundo. Manabí es la tercera provincia en producción Con el 60 %. En Cotopaxi se cultiva en La Maná, El Corazón y San Miguel. Debido a que los suelos de esta zona son en su mayor parte de origen volcánico, con precipitaciones promedio de 2 000 mm anuales, concentrados en el período lluvioso de diciembre a abril, en tanto que el período seco corresponde a los meses de junio a noviembre. Se estima que en total existen 80 000 hectáreas de plantaciones de edad avanzada.

Pero sin duda esta producción ha sido disminuida por la presencia de varias enfermedades, la moniliasis es causada por el hongo (*Moniliophthora roreri*) que ha causado mayor daño convirtiéndose en un factor limitante para la producción.

Con los siguientes antecedentes obtenidos se detectó la presencia de este fitopatógeno que impide una mayor productividad motivo por el cual se propone la siguiente investigación “Caracterización morfológica del hongo fitopatógeno de mayor pérdida económica en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*), el mismo que pretende brindar una base de información que servirá al agricultor para tomar decisiones oportunas y tener un guía para el control de enfermedades producidas por hongo fitopatógeno mediante el reconocimiento de los signos, síntomas y el ciclo de vida del patógeno, el cual permitirá reducir los costos e incrementar la producción, para obtener un producto de mejor calidad y aumentar ingresos económicos de los agricultores de la zona. Los resultados de la investigación también servirán para elaborar una guía didáctica para el control del hongo fitopatógeno y coadyuvar a la realización de planes de manejo de enfermedad en el Sector Los Laureles.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto económico en la producción del cultivo del cacao (*Theobroma cacao*), Sector Los Laureles, Cantón La Maná Cotopaxi. 2015.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo del cacao (*Theobroma cacao*).
- Identificar signos y síntomas del hongo fitopatógeno del cacao (*Theobroma cacao*) en campo.
- Caracterizar macro y microestructuras del patógeno.
- Describir el ciclo de vida del patógeno en condiciones de laboratorio.
- Elaborar una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo en estudio

PREGUNTA DIRECTRIZ

¿Se podrá caracterizar morfológicamente el hongo Fitopatógeno que causa mayor impacto económico en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*)?

CAPITULO I

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. EL CULTIVO DEL CACAO (*Theobroma cacao*)

El cacao es una fruta tropical, sus cultivos se encuentran mayormente en el Litoral y en la Amazonía. Es un árbol con flores pequeñas que se observan en las ramas y producen una mazorca que contiene granos cubiertos de una pulpa rica en azúcar. La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. En el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional. Es un Cacao Fino de Aroma conocido como 'Arriba', desde la época colonial. Ecuador es el país con la mayor participación en este segmento del mercado mundial (un 63% de acuerdo con las estadísticas de Pro Ecuador. Otro dato muy importante es que en el 2011, Ecuador recibió el premio como "mejor cacao por su calidad oral" y "mejor grano de cacao por región geográfica" en Salón du Chocolat en París, Francia. (LIDERES ,2013).

La evolución del cultivo en la costa ecuatoriana, Según fuentes históricas, desde principios de 1600 ya habían pequeñas plantaciones de cacao a orillas del río Guayas y se expandieron a orillas de sus afluentes el Daule y el Babahoyo, ríos arriba, lo cual originó el nombre de cacao "Arriba" en el mercado internacional, que va ligado a su denominación de origen. La variedad que da origen a este cacao se denomina nacional y botánicamente pertenece a los denominados forasteros amazónicos. La variedad nacional, productora del cacao arriba y reconocido mundialmente por su aroma floral, es producido exclusivamente por Ecuador. (ECUACOCOA, 2010).

El cacao ecuatoriano tiene una gran importancia económica en lo que se refiere al comercio nacional e internacional por lo que se le denomina 'la pepa de oro', como se conoce también al cacao ecuatoriano, existen dos entidades de apoyo a los exportadores, una de iniciativa estatal (ProEcuador) y una de gestión privada (Anecacao). ProEcuador es el Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones, parte del Ministerio de Comercio Exterior, encargado de ejecutar las políticas y normas de promoción de exportaciones e inversiones del país, con el fin de promover la oferta de productos tradicionales y no tradicionales, los mercados y los actores del Ecuador. Según sus estadísticas el 60% de la producción nacional es adquirida en los mercados de Estados Unidos de América, México y Holanda. Actualmente el precio de una tonelada de cacao en el mercado internacional está en alrededor de USD 3 000. (LIDERES ,2013).

De esta manera el cacao llega a ser el principal producto generador de divisas y recursos, fue aquel que permitió la creación de los primeros bancos del país y fue también el soporte para el manejo político y económico de los grupos gobernantes de turno. La producción de las haciendas de cacao se hacía contratando mano de obra barata y explotada, con peones provenientes de la costa y de la sierra. (ECUACOCOA, 2010).

1.1.1. Clasificación Botánica

Árbol de tamaño mediano (5-8 m) aunque puede alcanzar alturas de hasta 20 m cuando crece libremente bajo sombra intensa. Su corona es densa, redondeada y con un diámetro de 7 a 9 m. Tronco recto que se puede desarrollar en formas muy variadas, según las condiciones ambientales (ÁRTICA ,2008).

CUADRO 1: CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL CACAO

División	Magnoliopitas
Clase	Magnoliopsidas
Sub clase	Byttneriacea
Orden	Malvales
Familia	Esterculiaceas
Genero	Theobroma
Especie	Cacao

Según (ÁRTICA ,2008).

1.1.2. ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DEL CACAO

Según estudios realizados por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), el problema prioritario que afecta a la producción del cacao es la enfermedad de la moniliasis pasando a ser uno de los factores que causa mayores pérdidas económicas hasta de un 80% total de su producción. (INIAP, 2009).

1.1.2.1 La moniliasis del cacao

También conocida como Pudrición acuosa, Helada, Mancha Ceniza o Enfermedad de Quevedo, está causada por el hongo *Monilia* (*Moniliophthora roreri*). La enfermedad ataca solamente los frutos del cacao y se considera que constituye uno de los factores limitantes de mayor importancia en la producción de esa planta. Puede provocar pérdidas que oscilan entre un 16 y 80% de la plantación. La severidad del ataque de la *Monilia* varía según la zona y época del año, de acuerdo con las condiciones del clima. Aparentemente las temperaturas altas son más favorables para la diseminación de la *Monilia*. (ÁRTICA ,2008).

TABLA 2 Clasificación taxonómica de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*)

Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Familia	Marasmiaceae
Genero	<i>Moniliophthora</i>
Especie	<i>M.roreri</i>

Fuente:(Samson & Benny, 1978)

1.1.2.2 Características morfológicas del hongo (*Moniliophthora roreri*).

a) Micelio

El hongo presenta al menos tres tipos de micelio, dentro de las mazorcas las hifas (2 a 3 μm de ancho), son sinuosas, ramificadas e inicialmente intercelulares. A partir de estas forma “hifas efectivas” de 1 a 2 μm , con las cuales penetra a las células. Externamente, las hifas son ligeramente más gruesas, 4-5 μm de ancho, levemente comprimidas en las septas. En tejido en proceso de maceración, se presenta un micelio parecido al anterior pero de paredes gruesas, vacuolado, forma irregular y con hinchamiento que asemejan clamidiosporas en formación (Suárez y Delgado, 1993). *M. roreri* sale de la superficie de las mazorcas por

aperturas naturales (estomas) o heridas, formando una masa compacta de hifas o pseudomonas (Suárez y Delgado, 1993).

b) Conidióforos

Los conidióforos de (*M. roreri*) son hialinos, simples o ramificados; poco diferenciados de las hifas vegetativas frecuentemente no erectos, bifurcados en su parte distal y con una ligera constricción en la septa que lo separa del resto de la hifa de origen (Ram et al., 2004). Se forman especialmente en el frente de avance de la colonia; miden de 9-12 a 30- 50 μm de largo. (Suárez y Delgado, 1993).

c) Conidios

Son de forma globosa hasta elipsoide. Se traducen en cadenas de longitud variable, desde 2 ó 3 conidias, hasta 35 o más. Su maduración se produce, aparentemente de forma bisípeta. Las conidias jóvenes o de reciente separación de la cadena presentan vestigios de la pared celular de origen miden 7-10,9-14 μm en tejidos de mazorca momificadas y en cultivos viejos se observa la formación de clamidosporas (Suárez y Delgado, 1993).

1.1.2.3 Epidemiología

Estudios realizados recientemente en Ecuador para el desarrollo de *M. roreri* requiere una correlación de lluvias y una humedad relativa mayor a 80% y una temperatura de 25-28 C°. (Suárez y Delgado, 1993).

1.1.2.4 Proceso de infección y sintomatología

M. roreri es un hongo hemibiotrófico que forma irregularidades en el micelio intracelular. El proceso de infección empieza cuando los conidios de M. roreri llegan a la superficie de las mazorcas. Ahí germinan y penetran la mazorca directamente desde la epidermis, causando daños internos en las primeras etapas de la enfermedad. Síntomas externos como pequeñas partes oscuras en la superficie de las mazorcas pueden ser vistas después de 40 a 80 días de infección; además, las mazorcas infectadas son asintomáticas en las primeras etapas de la infección, que es un factor que no le da la oportunidad a los humanos para saber si están transportando mazorcas infectadas. (ÁRTICA ,2008).

Una semana después de la aparición de lesiones oscuras, el característico polvo blanco de la enfermedad en la superficie de las mazorcas infectadas. La apariencia polvorienta es debido a la presencia de millones de conidias que pueden alcanzar a 44 millones por centímetro cuadrado en una mazorca madura infectada, esta es capaz de crear 7 mil millones de esporas. (ÁRTICA ,2008).

1.1.2.5 Ciclo de vida y características de la infección.

El ciclo de vida es el conjunto de etapas ocurridas desde el momento en que la spora infecta una mazorca, germina, crece y genera nuevamente estructuras infectivas es decir nuevas esporas.(ÁRTICA ,2008).

Para que se inicie la infección es necesario que la mazorca este húmeda, la humedad es la condición suficiente para que esta enfermedad se desarrolle. (ÁRTICA ,2008).

Una mazorca esporulada ubicada a unos dos metros de altura es capaz de infectar hasta el 40% de las mazorcas vecinas que estén a 20 metros de distancia.

La infección de Monilia ocurre principalmente en las primeras etapas del crecimiento de las mazorcas. (ÁRTICA ,2008).

1.1.2.6 Síntomas

- 1.-Los pepinos menores de un mes presentan maduración prematura marchitez y secamiento los frutos de 1 a 3 meses se tornan abultados y deformes.
- 2.-Las mazorcas infectadas de 2 a 3 meses presentan puntos verde oscuro o deformaciones.
- 3.-Mazorcas atacadas de mayor de tres meses presentan puntos aceitosos, islas amarillentas o maduración.
- 4.-Luego de los primeros síntomas aparece una mancha de color marrón o chocolate cubierta con una sustancia blanquecina.
- 5.-Finalmente el color blanco se torna gris con aspecto de ceniza la razón es que la semilla de la enfermedad se presenta como un polvo que se desprende fácilmente con el viento o con el movimiento de la fruta.

La primera señal de la infección; es la aparición de puntos o pequeñas manchas de un color que sugiere una maduración prematura en mazorcas que aún no han alcanzado su desarrollo completo. Las mazorcas con infecciones ocultas con frecuencia presentan tumefacciones. Cuando estas mazorcas se abren se encuentran más o menos podridas en su interior y parecen más pesadas que las mazorcas sanas de igual tamaño. (ÁRTICA ,2008).

1.1.2.7 Control

Cuando la espora o semilla del hongo germina produce unas estructuras llamadas hifas infectivas que se encargan de penetrar el fruto la infección llega a los tejidos centrales incluyendo los granos de cacao e inicia el desarrollo de la necrosis desde la parte interna, finalmente el fruto es el único órgano infectado.

Para el combate de la enfermedad se ha recomendado las siguientes prácticas:

- 1.-Disminuya los niveles de sombreado en el caso de que este en exceso.
- 2.-Disminuya los arboles improductivos.
- 3.-Pode los arboles productivos y sanos para disminuir su altura, esto facilita el alcance de frutos enfermos.
- 4.-Haga drenajes para evitar encharcamientos. (ÁRTICA ,2008).

1.1.2.8. TRATAMIENTO EN LABORATORIO DE LA MONILIASIS DEL CACAO (*Moniliophthora roreri*)

Desinfección de las muestras

Las muestras de mazorcas recolectadas en campo, se colocaran en fundas de papel kraft; luego se llevaran al laboratorio donde serán, analizadas según sus síntomas y codificadas. Seguidamente se seleccionarán (semilla, mucílago, parte interna sana, parte interna enferma, etc.) y se colocarán en hipoclorito de sodio al 10% para su desinfección. (DSPACE ESPOL, 2014).

Siembra de las muestras

Las muestras ya desinfectadas se sembrarán en cajas Petri que contendrá el medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA) y Agar Nutritivo (AN); posteriormente se colocarán en una incubadora a 27° C. (DSPACE ESPOL, 2014).

Selección de muestras por el color y textura

De las muestras obtenidas en cada una de las zonas, se elegirán crecimientos del hongo (*M. roreri*) de acuerdo a las características morfológicas diversas que presentan, basada en las observaciones diarias de color y textura de la colonia, realizando cinco repeticiones por cada uno. (DSPACE ESPOL, 2014).

Forma y tamaño de conidias

La evaluación de la forma y tamaño de las conidias se realizara a partir de los microcultivos obtenidos en medio sólido V8MAA sobre láminas porta objeto. El medio de cultivo será depositado en las láminas; se realizará la inoculación con esporas del hongo y posteriormente se colocarán en una incubadora a 27° C en oscuridad. (DSPACE ESPOL, 2014).

El tamaño de conidias de los aislamientos obtenidos se determinará midiendo el largo y ancho de 10 conidias escogidas completamente al azar, utilizando un micrómetro ocular. La fórmula aplicada para determinar el tamaño real de las conidias en un lente de 40X será la siguiente. (DSPACE ESPOL, 2014).

1.1.3 HONGOS FITOPATÓGENOS

(HERRERA Y MAYEA, 1994) Manifiesta que los biólogos utilizan el término hongo para incluir organismos eucarióticos, esporógenos, sin clorofila.

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que tienen quitina, celulosa, o ambos componentes. (AGRIOS G, 1999).

1.1.3.1 Características generales

Los hongos son organismos carentes de clorofila que se reproducen mediante esporas. Son por lo general filamentosos y multicelulares, con núcleos que se observan con facilidad. Los filamentos constituyen el cuerpo (soma) de los hongos que se alargan mediante un crecimiento especial y un pequeño fragmento de ellos puede reproducirse un nuevo individuo. (HERRERA Y MAYEA, 1994).

Las estructuras reproductivas se diferencian de las somáticas y sobre la base de sus características se clasifican los hongos. Las estructuras somáticas de los diversos hongos son muy similares y pocos pueden ser identificados cuando no se presentan las estructuras reproductivas. (HERRERA Y MAYEA, 1994).

1.1.3.2 Estructuras somáticas

El talo de los hongos consiste típicamente en filamentos microscópicos ramificados hacia todas partes y que se extienden sobre o dentro del sustrato que se utiliza como alimento. Estos filamentos se denominan hifas. El conjunto de hifas constituyen el micelio de los hongos. (HERRERA Y MAYEA, 1994)

Las hifas pueden ser septadas o sin septos (lisas o cenocíticas) este último tipo de hifa es característico de los hongos inferiores y cuando envejecen pueden formarse septos en varios lugares. Los septos varían en su estructura y pueden ser simples o complejos. (HERRERA Y MAYEA, 1994).

El micelio en algunos hongos forma gruesos cordones denominado rizomorfos que semejan raíces, son resistentes a condiciones adversas y permanecen en estado de letargo hasta que se presentan condiciones favorables. (HERRERA Y MAYEA, 1994)

1.1.3.3 Hongos como patógenos en las plantas

El efecto nocivo de los hongos se debe a su capacidad para destruir físicamente los tejidos de la planta, alterar la fisiología vegetal reduciendo el crecimiento de toda la planta o de órganos determinados, o producir toxinas que afectan tanto a plantas como animales. Algunos hongos, conocidos como biótrosos, pueden crecer y multiplicarse manteniéndose durante todo su ciclo de vida en la planta huésped, viviendo y obteniendo nutrientes sin causar la muerte. Otros son necrótrosos, en una parte de su ciclo vital requieren una planta huésped pudiendo crecer sobre tejido muerto o producir la muerte celular para absorber los nutrientes del tejido muerto. (AGRIOS G, 1999).

1.1.3.7 Inducción al desarrollo miceliar

Recomienda utilizar una trozo del hospedante para inducir al desarrollo miceliar aquellos hongos biótrosos para que el hongo crezca y esporule sobre medios de cultivos recomendables para hongos que esporule poco en el tejido, tales como hongos de la raíz.

Este método es el más usado cuando se quiere tener a un hongo en cultivo puro.

- Lavar el material enfermo con agua corriente y secar.
- Seleccionar el tejido vegetal afectado procurando que los trocitos queden de 0,3 a 0,5 cm de longitud.
- Enjuagar los trocitos en 3 pasos de agua destilada y secarlos perfectamente, al secar bien, disminuyen las contaminaciones pasar 4 a 5 secciones a una caja de Petri con PDA, selle la caja con cinta adhesiva e incube de 20 a 25 °C. (AGRIOS G, 1999).

1.1.3.8 Lavado de tejidos afectados.

Partes subterráneas: deben lavarse bajo agua corriente, con la ayuda de un cepillo suave. Para casos difíciles como de algunos ficomicetos patógenos sensibles a desinfectantes, se alarga el proceso de lavado para eliminar el uso de desinfectantes. Se colocan porciones de las raíces lavadas en un frasco tapado con una malla o gasa y se deja caer un chorro de agua sobre este durante dos o más horas. (HERRERA, 1994).

Partes aéreas: los órganos aéreos son generalmente difíciles de mojar. Una sumersión instantánea en alcohol etílico 70% antes de introducir en agua o el uso de detergente líquido como “Tween” (unas 2-3 gotas por litro) generalmente resuelve el problema. Los tejidos aparentemente limpios no necesitan lavado, excepto el que se hace durante la desinfección. (HERRERA, 1994).

1.1.3.11 Identificación de hongos

Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de sus estructuras somáticas y reproductivas. Mediante la técnica de cámara húmeda y/o aislamiento es posible inducir la aparición de estas estructuras producidas y el uso de claves taxonómicas son necesarios para determinar el género y la especie del hongo patógeno. (HERRERA, 1994).

Plasmodio: se refiere al cuerpo o soma vegetativo de algunos hongos inferiores, el cual está constituido por una masa multinucleada, sin pared celular. Son escasos los hongos fitopatógenos que poseen soma vegetativo de tipo plasmodial.

Micelio: la mayoría de los hongos poseen cuerpos filamentosos provistos de pared celular. A los filamentos que constituyen el cuerpo o soma vegetativo se les denomina hifas. Al conjunto de hifas se le denomina micelio. Cuando las hifas no presentan septas, el micelio es denominado cenocítico o no tabicado y cuando las presenta el micelio es tabicado.

1.1.5.3 Signos y síntomas de hongos patógenos en la planta

Los síntomas que producen los hongos en sus hospedantes son de tipo local o general y pueden aparecer por separado en hospedantes distintos, en un mismo hospedante aparecer uno después de otro en un mismo hospedante. En general, los hongos producen una necrosis local o general o la muerte de los tejidos vegetales que infectan, hipertrofia e hipoplasia o atrofia de plantas completas o de sus órganos, e hiperplasia o crecimiento excesivo de ellas o de algunos de sus órganos. (AGRIOS G, 1999).

Según (AGRIOS G. , Fitopatología 2 ed, 1999) los síntomas necróticos más comunes son los siguientes:

- Ahogamiento o secadera: Muerte rápida y colapso de plántulas muy jóvenes que se cultivan en el campo o en el almácigo.
- Antracnosis: Lesión necrótica que se asemeja a una úlcera profunda y que se produce en el tallo, hojas, frutos o flores de las plantas hospedantes.
- Cancro: Herida localizada o lesión necrótica; con frecuencia sumida bajo la superficie del tallo de una planta leñosa.

- Decaimiento: Crecimiento deficiente de las plantas; las hojas son pequeñas, quebradizas, amarillentas o de color rojo; las plantas muestran cierto grado de defoliación y muerte descendente.
- Manchas foliares: Lesiones localizadas en las hojas de los hospedantes que constan de células muertas y colapsadas.
- Muerte descendente: Necrosis generalizada de las ramitas de las plantas que se inicia en sus puntas y avanza hacia su base.
- Pudrición basal del tallo: Desintegración de la parte inferior del tallo.
- Pudrición de la raíz: Pudrición o desintegración de todo el sistema radical de una planta o parte de él.
- Pudriciones blandas y pudriciones secas: Maceración y desintegración de frutos, raíces, bulbos, tubérculos y hojas carnosas de las plantas.
- Sarna: Lesiones que se producen sobre el fruto, hojas, tubérculos y otros órganos de las plantas hospedantes, por lo común ligeramente realzadas o bien profundas y agrietadas, lo cual les da una apariencia costrosa.
- Tizón: Coloración café general y extremadamente rápida de las hojas, ramas, ramitas y órganos florales de una planta, que dan como resultado la muerte de estos órganos.

(AGRIOS G, 1999), también manifiesta que los síntomas que se asocian a la hipertrofia o hiperplasia y distorsión de los órganos de las plantas incluyen:

- Agallas: Porciones alargadas de las plantas que por lo común están llenas del micelio del hongo.
- Enchinamiento foliar: Deformación, engrosamiento y enchinamiento de las hojas.
- Hernia de las raíces: Raíces alargadas en forma de huso o mazo.
- Verrugas: Protuberancias en forma de verruga que se forman sobre los tubérculos y los tallos.

Además (AGRIOS G. , Fitopatología 2 ed, 1999), indica que de los síntomas que ya se han mencionado, pueden añadirse otros grupos de síntomas:

- **Marchitamiento:** Por lo común, es un síntoma secundario generalizado en el que las hojas o los retoños de las plantas pierden su turgencia y se cuelgan debido a las alteraciones que sufre el sistema vascular de la raíz o del tallo.
- **Mildiu:** Zonas necróticas o cloróticas que aparecen sobre las hojas, tallo y frutos de una planta y que por lo común se cubren con el micelio y los cuerpos fructíferos del hongo.
- **Roya:** Muchas lesiones pequeñas, por lo común de color rojizo, que aparecen sobre las hojas o el tallo de las plantas.

En muchas enfermedades, el patógeno se desarrolla, o produce varias estructuras, sobre la superficie de su hospedante. Estas estructuras, que incluyen al micelio, esporóforos, cuerpos fructíferos y esporas, se les denomina signos y difieren de los síntomas, los cuales solo se refieren a la apariencia que toman las plantas o sus tejidos cuando han sido infectados. (AGRIOS G, 1999).

Por ejemplo, en los mildius, lo que se observa con mayor frecuencia son los signos representados por las esporas y el crecimiento vellosos y blancuzcos del micelio del hongo sobre las hojas, frutos o tallos de la planta, mientras que los síntomas consisten en lesiones necróticas o cloróticas que aparecen sobre las hojas, frutos y tallos, crecimiento deficiente de la planta, etc. (AGRIOS G, 1999).

1.1.5.4 Calidad de la muestra

Este aspecto es de suma importancia puesto que con frecuencia las muestras tomadas no llegan al lugar de destino con la calidad requerida para poder realizar una labor investigativa eficiente. Al tomar la muestra enferma no se deben seleccionar las partes u órganos que manifiestan estado avanzado sino aquellas partes que manifiesten aun un proceso de desarrollo. (HERRERA M. y., 1994).

La conservación y el almacenamiento de las muestras hasta su llegada al laboratorio deben tenerse muy en cuenta; para ello se aconseja el empleo de envases que no acumulen excesiva humedad y eviten la proliferación de organismos secundarios, así como mantener las muestras, de ser posible bajo temperaturas que inhiban el desarrollo de microorganismos.(HERRERA, 1994).

El empleo de técnicas de herborización natural le permite en algunas circunstancias y por algunas enfermedades causadas por hongos, conservar las muestras inalterables durante largo tiempo, como ocurre en numerosas enfermedades foliares. (HERRERA, 1994).

1.1.5.5 Recomendaciones para toma de muestras - sanidad vegetal

La muestra debe recogerse en bolsas de plástico limpias, debidamente codificadas y manteniendo la boca de la bolsa abierta para evitar putrefacciones.

Si la muestra debe ser enviada por correo, se envolverá en papel de periódico para absorber la humedad de la misma. Si la muestra es de semillas, podrán recogerse en bolsas de plástico, botes de cristal o sobres de papel limpios, con su correspondiente código de identificación. (INIAP, 2009).

1.1.6.1 Métodos de aislamiento

Para lograr el aislamiento del agente causal de una determinada sintomatología o enfermedad, en primer lugar, se debe establecer la causa que originó dichos trastornos, es decir permite llegar a diagnosticar la naturaleza del agente causal. No obstante, es muy común cuando se utilizan técnicas o métodos para el aislamiento del agente causal, que más de un organismo sea obtenido. (AGRIOS G, 1999).

1.1.6.2 Aislamiento de hongos

El aislamiento de los hongos fitopatógenos se puede realizar frecuentemente con cierta facilidad, ya que sobre el tejido enfermo de una planta suelen encontrarse solamente las estructuras de un organismo causantes, sin la presencia de otros microorganismos contaminantes. Como ejemplo de este tipo de situación puede citarse el caso de los mildius y carbones, que fructifican profundamente sobre tejidos afectados. Las royas, que fructifican también abundantemente, son difíciles de aislar in vitro. Sin embargo en la mayoría de los casos se requiere de métodos específicos de aislamiento, los cuales dependen principalmente de la naturaleza del hongo en cuestión y del sustrato o planta hospedante en que se desarrolló. Tal es el caso de la mayoría de los hongos fitopatógenos del suelo. El autor antes mencionado indica que en otras ocasiones numerosos hongos que producen estructuras reproductoras sobre el sustrato natural que parasitan no lo hacen en medios artificiales, por lo que para su identificación hay que prescindir de métodos de aislamientos. Un caso particular son los hongos de la clase Ascomycetes que raramente producen sus cuerpos fructíferos sobre medios artificiales.

El aislamiento de los hongos productores de micelio aéreo esporógeno resulta exitoso simplemente transfiriendo directamente el micelio o masas de esporas formadas sobre el tejido de la planta, sobre un medio determinado. Cuando el crecimiento del micelio o la formación de esporas no es apreciable sobre el tejido de la planta hospedante se emplea la técnica conocida como cámara húmeda, que consiste en tomar porciones o pedazos de dicho tejido, lavarlo bajo un chorro de agua corriente durante 10 o 15 minutos para remover de la superficie las esporas de otros hongos y colocarlos luego sobre papel de filtro humedecido dentro de placas de Petri e incubar dentro de varias horas a temperatura entre 26 y 30 °C. Para el aislamiento de hongos presentes en el interior de la planta (haces vasculares, frutos, tubérculos, etc.)

Debe procederse a la desinfección productos antes descritos, cortar el tejido con un bisturí o escalpelo estéril y extraer porciones afectadas y colocarlas o sembrarlas en un medio apropiado que favorezca el crecimiento de las estructuras vegetativas o reproductoras. (AGRIOS G, 1999).

1.1.6.3 Aspectos a contar en el estudio de los hongos en laboratorio

Los hongos son capaces de crecer en cualquier medio de cultivo, sin embargo para evitar su contaminación por bacterias, los medios de cultivo deben presentar altas concentraciones de soluto y bajo pH.

1.1.6.4 Medios de cultivos usados en el aislamiento de hongos

(FRENCH & HEBERT, 1980) manifiestan que los medios de cultivo utilizados habitualmente que se encuentran en el mercado son:

- **AGAR PAPA DEXTROSA (PDA).** Es un medio útil para valorar el aspecto morfológico y la coloración de la colonia. Su alto contenido de carbohidratos condiciona un mayor crecimiento, el detrimento de la esporulación que suele retrasarse hasta un mes, las colonias pueden ser atípicas. (ECHANDI, 2001).

Este medio de cultivo se puede preparar con papas naturales o con el producto comercial deshidratado. Para preparar este medio de cultivo es a partir de papas naturales se procede de la siguiente manera se lavan de 200 a 300 gramos de papas no es necesarios pelarlas, rebanarlas y hervirás hasta que estén suaves y exprimirlas a través de tres capas de materia delgada. Reciba el filtrado en un matraz añada 20 gr de dextrosa y 20 gr de agar afore a un litro. Esterilice los medios 20 minutos a 15 libras de presión. Cuando el medio este casi frio (40°C) viértalo en las cajas Petri Los conidios formados en PDA no son consistentes en tamaño y forma además de que son menos confiables para utilizarse con fines de investigación. (CIAMPI, 2002)

Sin embargo la morfología de la colonia pigmentación del medio y rango de crecimiento. La mayoría de especies de monilias en pida son consistentes si el medio es preparado de una manera consistente, y las cepas provienen de un inóculo estándar y han sido incubadas bajo condiciones estándar. (ECHANDI, 2001)

- Estas características son utilizadas por lo regular como criterio secundario para la identificación. En el cultivo de PDA es utilizado por varios investigadores para el aislamiento de especies presentes. Se utiliza para recuperación de hongos provenientes de las plantas entonces se debe reducir la concentración de papa dextrosa entre un 50 a 75% para inhibir el crecimiento de bacterias. (ECHANDI, 2001)

1.1.8 Estructuras reproductivas

1.1.8.1 Hongos inferiores y pseudohongos

Los hongos inferiores se caracterizan por poseer micelio cenocítico. Según su reproducción sexual estos hongos pueden pertenecer a dos diferentes clases:

Clase: Oomycetes: (Ficomicetes) Esta clase de hongos producen oosporas, las que se originan por la unión de dos gametos diferentes, el oogonio y el anteridio. Estas oosporas son esféricas y de pared gruesa. Estos hongos se reproducen asexualmente por medio de esporas flageladas, denominadas zoosporas. Estas zoosporas se encuentran contenidas en cuerpos fructíferos denominados zoosporangios.

Clase: Zigomycetes: Esta clase de hongos produce esporas asexuales no móviles contenidas en cuerpos fructíferos denominados esporangios. Sexualmente producen esporas denominadas zigosporas.

1.1.8.2 Hongos superiores

Estructuras representativas de la clase Ascomycetes: La clase ascomycetes se caracteriza por poseer micelio tabicado y producir esporas de origen sexual denominadas Ascosporas. Estas ascosporas se producen dentro de sacos llamados ascas. Las ascas pueden encontrarse en forma libre o contenida en cuerpos fructíferos. Los cuerpos fructíferos pueden ser de dos tipos: Apotecios y Cleistotecios.

Estructuras representativas de la clase Basidiomycetes: La clase basidiomycetes se caracteriza por tener micelio tabicado y reproducirse sexualmente mediante la producción de basidioporas. Estas son producidas exógenamente sobre una estructura llamada basidio. Los basidios pueden ser septados o no.

Estructuras representativas de la clase Deuteromycetes: Esta clase incluye a los hongos superiores (micelio tabicado) a los que no se les conoce la reproducción sexual. En algunos casos por no tener reproducción sexual, o si la tienen esta se produce rara vez, o simplemente porque no se le conoce aún. Estos hongos se reproducen de forma asexual formando esporas denominadas conidios. Estos conidios pueden producirse en forma libre o dentro de cuerpos fructíferos. Los conidios pueden tener diferentes formas y tamaños. Pueden ser hialinos u oscuros. Pueden ser unicelulares o multicelulares. Pueden estar sueltos o agrupados en ramilletes o cadenas.

CAPÍTULO II

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Materiales

2.1.1. Recursos humanos.

- Autor: Oña Cuyachamín Nancy Jeaneth
- Director de Tesis: Ing. Guadalupe López. Mg.
- Miembros del tribunal:
- Ing. Karina Marín
- Ing. Santiago Jiménez
- Ing. Luis Benavides

2.1.2. Materiales de campo

- Muestras de frutas y semillas del cacao (*Theobroma cacao*)
- Bisturí
- Fundas plásticas
- Fundas de papel
- Cámara digital

- Libro de campo
- Lápiz
- GPS
- PH metro
- Flas memory

2.1.3. RECURSOS TECNOLÓGICOS

EQUIPOS

- Cámara de crecimiento o incubadora
- Balanza de precisión
- Estufa de 2 quemadores
- Estereoscopio
- Refrigeradora
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Cuenta colonias
- Microondas
- Desecador con mallas

2.1.4. MATERIALES DEL LABORATORIO

- Micro tubos
- Goteros de plástico
- Papel aluminio

- Pizeta
- Marcadores permanentes
- Aguja de disección
- Asa de siembra
- Reposeros plásticos con tapa
- Cajas Petri
- Papel absorbente
- Parafilm de laboratorio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Vaso de precipitación de 50-100-500-1000 ml
- Erlenmeyer de 500-1000 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Tarrinas de ½ litro transparente
- Tanque de gas
- Cinta adhesiva transparente de 1,5 cm de ancho
- Pinzas
- Bisturí
- Tijeras con punta.

2.1.6. REACTIVOS

- Agua destilada
- Agar
- Dextrosa o sacarosa
- Alcohol antiséptico

2.2 UBICACIÓN DEL ENSAYO

La siguiente investigación se llevó a cabo en la provincia de Cotopaxi Cantón La Maná Parroquia La Matriz Sector, Los Laureles mismo que se encuentra ubicado en la parte sureste del Cantón La Mana.

CUADRO: 3 COORDENADAS GEOGRÁFICAS

Ubicación	ECUADOR
coordenadas	07° 06' 19" S 98° 09' 32" W
altitud	586 msnm

2.3 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

CUADRO: 4 UBICACIÓN POLÍTICA

País	Ecuador
Provincia	Cotopaxi
Capital	Latacunga
Cantón	La Maná
Altitud	584 m.s. n. m.
Ubicación	Nor-oeste de la provincia de Cotopaxi

Elaboración: Del investigador

3.2 UBICACIÓN DEL LABORATORIO

El lugar donde se realizó la investigación está ubicado en la provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga en la Avenida Eloy Alfaro.

CUADRO: 5 UBICACIÓN DEL LABORATORIO

Ubicación	ECUADOR
Coordenadas	56° 56 00 "S 78° 37 00" W
Altitud	2650 msnm
Temperatura	13°C

2.4. DISEÑO METODOLÓGICO.

2.4.1. Tipo de investigación.

Investigación descriptiva

Con esta investigación se pudo puntualizar los fenómenos que ocasionaron la presencia de esta enfermedad con las características presentadas en la población del cultivo el mismo que permitió identificar y recopilar información acerca de las características morfológicas que presenta el hongo.

Además los resultados que se obtuvieron en esta investigación serán procesados para discutir y puntualizar aspectos relevantes.

2.5. Método.

2.5.1.1.Descriptivo y exploratorio

Se visitó el lugar de la recolección de muestras donde se observó detenidamente el lugar y el estado del cultivo del cacao (*Theobroma cacao*) donde se determinó la presencia de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*).en los frutos del árbol de cacao el mismo que nos permitió seleccionar muestras adecuadas para el proceso de la investigación.

2.5.1.2.Deductivo.

Para el avance de la investigación se empleó este método porque nos permito recopilar la información de las característica morfológica que presentan el Hongo permitiendo Identificar al Hongos fitopatógeno de mayor pérdida económica en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*).

2.6.1.3. Comparativo.

Es un procedimiento donde se realizó una de búsqueda sistemática de similitudes con el objeto de estudiar su parentesco entre la identificación de los hongos y para encontrar el patógeno de mayor perdida en el cultivo y con su forma de reproducción.

2.7. TÉCNICA

Se utilizó la técnica del fichaje con el que se obtuvo información en campo mediante entrevistas al agricultor y atreves de la toma de muestras de frutos enfermos el mismo que ayudo cumplir la expectativas propuestas. En campo y en el laboratorio se pudo analizar con profundidad las características de dicho hongo.

2.8. METODOLOGÍA.

2.8.1. Delimitación del lugar de recolección

Las muestras se recolectaron en el sector Los Laureles que está ubicado en la parte sureste del cantón la Mana la misma que se limita al norte con el recinto San Pedro al sur con el recinto san Pablo al este con el rio San Pablo al oeste con el cantón Pangua.

2.8.2. Diagnóstico del cultivo.

Para realizar el diagnóstico se siguió la secuencia propuesta por Rubert Streets (1972).

- Se identificó la planta hospedante: en este caso fue al cacao (*Theobroma cacao*)
- Se utilizó información propia y del productor.
- Se investigó el mantenimiento del cultivo.
- Se observó los síntomas de la enfermedad a detalle en este caso se observó maduración prematura el fruto con manchas de color marrón o chocolate cubierta con una sustancia blanquecina y bayas pequeñas ya muertas

2.8.4. Toma de muestras.

Para realizar esta actividad se escogió árboles de cacao (*Theobroma cacao*) con mayor cantidad de frutos que contenían la presencia del hongo de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en diferentes estado biológico.

Luego cada una de las muestras fueron etiquetadas para luego estudiarlas en laboratorio.

2.8.5. Toma de muestras.

El método utilizado para esta actividad fue por cuotas, el mismo que consiste escoger un cierto número de individuos que reúnen unas determinadas características, se eligieron las plantas que presentaban mayor grado de afectación.

2.8.5.1. Procedimiento en la toma de muestras.

Se extrajo frutos afectados utilizando bisturí y tijeras, los materiales fueron esterilizados con alcohol en cada corte que se realizó para evitar la contaminación de hongo. Luego cada una de las muestras fueron embazadas en bolsas de papel para disminuir la humedad, seguidamente se procedió a colocar las bolsas en fundas ziplop con su respectiva codificación posteriormente se trasladó a la hilera para evitar la deshidratación de las muestras.

2.9 Laboratorio

2.9.1 Aislamiento

Se procedió a tomar frutos con presencia de tejidos enfermos posteriormente se procedió a secar los tejidos con papel absorbente, y por último se desinfecto en una solución 2:1 de cloro, se lavó dos veces con agua destilada estéril y se eliminó excesos de agua, colocamos el interior de una caja de Petri estéril que contenga papel filtro esterilizado, este material lavado, desinfectado y seco se coloca en cajas con PDA y/o Jugo v 8 agar solidificado. Se incuba a 22-24 °C luego se pasó a observar las características que presenta el patógeno durante los siguientes 5 días.

2.9.2 Purificación

Se cortó puntas de micelio del borde de la colonia en crecimiento, mediante la utilización de agujas de disección flameadas, posteriormente esta pequeña porción del hongo se depositó en cajas de petri con medios de cultivo estéril y de esta forma se obtuvo cultivos puros.

2.9.3 Inoculación

La inoculación del hongo fitopatógeno se realizó en un l medio de cultivo, bajo condiciones controladas de esterilidad y asepsia. Para esta práctica se esterilizo todos los materiales de uso.

En este proceso se realizó un raspado de la parte afectada donde se encontraba el hongo, luego se procedió a la siembra de esporas o haustorios en los medios de cultivos y por ultimo realizamos el cierre hermético de la caja Petri con Para film.

2.9.4 Incubación

Para el proceso de incubación se colocó los medios de cultivo a una temperatura de 24 °C y con el 70% de humedad relativa, durante 7 días aproximadamente según tengamos el desarrollo de los micelios del hongo.

2.9.5 Identificación

Se procedió a realizar un dobléz de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostendrá con una pinza. Con el lado adhesivo se tomó con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo a estudiar, después colocamos una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se procede a pegar la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un aumento de 40x y 100x.

Con un asa estéril (o una aguja de disección), se tomó una pequeña muestra del hongo y se colocó en un portaobjetos con una gota de agua destilada, con el mismo asa se extendió el micelio, se colocó el cubreobjetos y se procedió a observar al microscopio de 40x y 100x.

Con la ayuda de un bisturí estéril se cuadrícula el medio de cultivo de la caja de Petri con PDA en cuadros de aproximadamente 1 cm², este paso se realizó en el interior de una campana de flujo laminar preparada para trabajar bajo condiciones asépticas

1. Dentro de la cámara de flujo laminar, con la ayuda de un bisturí estéril, uno de los cuadros de PDA se transfirió al portaobjetos que está en la cámara de microcultivo; este portaobjetos debe de estar sobre el triángulo de vidrio.
2. Con la aguja de disección estéril o con un asa bacteriológica estéril se lleva el inóculo a las orillas superiores e inferiores del cuadro de PDA.
3. Se colocó el cubre objetos sobre el cuadro de PDA inoculado, procurando que quede bien centrado.
4. Se agregó 2ml de agua estéril, en el fondo de la cámara de microcultivo para mantener la humedad, sin mojar el área de crecimiento del hongo. Los pasos 1-5 se llevan a cabo en el interior de una campana de flujo laminar o en mesas de trabajo en condiciones asépticas.
5. Se selló la caja Petri del microcultivo con el Parafilm y se rotulo.
6. El crecimiento del hongo se detiene cada 24,
7. Se repiten los pasos del 1 al 7 para mas microcultivos, y detener su desarrollo a la 48, 72 y 96 horas. Respectivamente.

2.9.6 Descripción

Para esto se utilizó el método comparativo a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de claves taxonómicas

De las cepas aisladas se hizo observaciones macroscópicas tales como: forma de la colonia del hongo, color característico del medio de cultivo, halo de crecimiento de cada una de las colonias.

Luego se procedió a realizar placas fijas de cada una de las cepas aisladas para posteriormente observar las estructuras microscópicas tales como: forma del conidiosporo, esporangiosporos, forma y tamaño de las esporas o conidios.

Para realización las placas fijas se procedieron de la siguiente manera:

- Se prepararon las cajas petri con las cepas de hongos aislados, una en cada caja Petri.
- Se tomaron un trozo de cinta masking transparente de seis cm. de largo y se fijaron en el cuerpo fructífero, tomando directamente de la caja Petri, donde se encuentran las cepas puras.
- Se observaron al microscopio con objetivo de adecuados y se procedió a tomar fotografías microscópicas de las diferentes estructuras con una cámara.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Observación en Campo

3.1.1 Hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo de cacao (*Theobroma cacao*)

Mediante la visita realizada al cantón La Maná perteneciente a la provincia de Cotopaxi sector Los Laureles se pudo determinar la presencia de la enfermedad de presentan mayor impacto económico en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*), causando pérdidas desde el 20 a 80% sin control esta enfermedad puede llegar a causar pérdidas de todo el cultivo. (ACEPROCACAOL, 2012).

Uno de los mayores problemas que enfrenta el cultivo del cacao, son los de carácter fitosanitario, situación agravada por el escaso manejo del cultivo especialmente en los aspectos sanitarios, la inadecuada selección de material genético y la avanzada edad de los cultivos; aspectos estos que han favorecido la mayor incidencia de enfermedades causadas por hongos, entre los que sobresale la moniliasis (*Moniliophthora roreri*).

Por la cual se estima que el Ecuador pierde más del 40% de la producción, que expresada en grano comercial equivale a más de 70.000 toneladas y 150 millones de dólares por año. (ACEPROCACAOL, 2012.)

De la misma manera en el Ecuador son varias las enfermedades que atacan al cultivo del cacao (*Theobroma cacao*) y una de las que presentan mayor impacto económico que causa grandes bajas y pérdidas de un ,16- 90% es la moniliasis causada por el hongo (*Moniliophthora roreri*) (ÁRTICA ,2008).

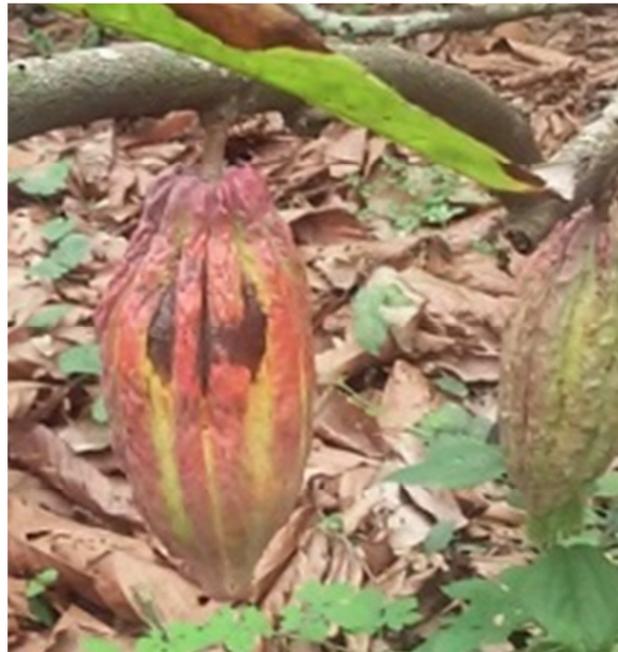


Imagen N°1 En campo el hongo (*Moniliophthora roreri*)

Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015.

3.2. CUADRO: 6 Signos y síntomas de la enfermedad moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*) en campo

Bibliográficamente	Investigación realizada en campo	Imágenes de signos y síntomas observados en campo
Según Ártica afirma que los pepinos menores de un mes presentan maduración prematura.	Mediante la visita realizada en campo se pudo observar pepinos pequeños con maduración prematura	 <p>Imagen: 2</p>
ICA, afirma que la mazorca atacada de mayor a tres meses presenta frutos aceitosos con islas amarillentas o maduración.	Frutos aceitosos con puntos amarillentos con maduración prematura.	 <p>Imagen: 3</p>
Ártica afirma que luego de los primeros síntomas aparece una mancha de color marrón o chocolate cubierta con una mancha blanquecina.	Frutos con manchas de color café con presencia de una sustancia blanquecina	 <p>Imagen: 4</p>
Según Ártica el color blanco se torna gris con aspecto de ceniza	Presencia de un polvo color cenizo en los frutos	 <p>Imagen: 5</p>

3.3 Observación en laboratorio

3.3.1 Macro y microestructuras del hongo (*Moniliophthora roreri*)

La siembra se realizó en 3 cajas Petri de plástico esterilizadas de 9cm de diámetro los mismos que contenían el medio de cultivo realizados con PDA papa dextrosa, para ello se colocó un disco micelial de 5 mm de diámetro extraídas del cultivo infectado de una edad de 3 años, posteriormente la caja fue sellado con papel parafinado (parafilm) El tipo de reproducción realizada es asexual porque se utilizó muestras extraídas de frutos infectadas del cultivo en el campo el mismo que fue realizado, en un laboratorio por un periodo de 3 días con una temperatura de 23 a 24° C.

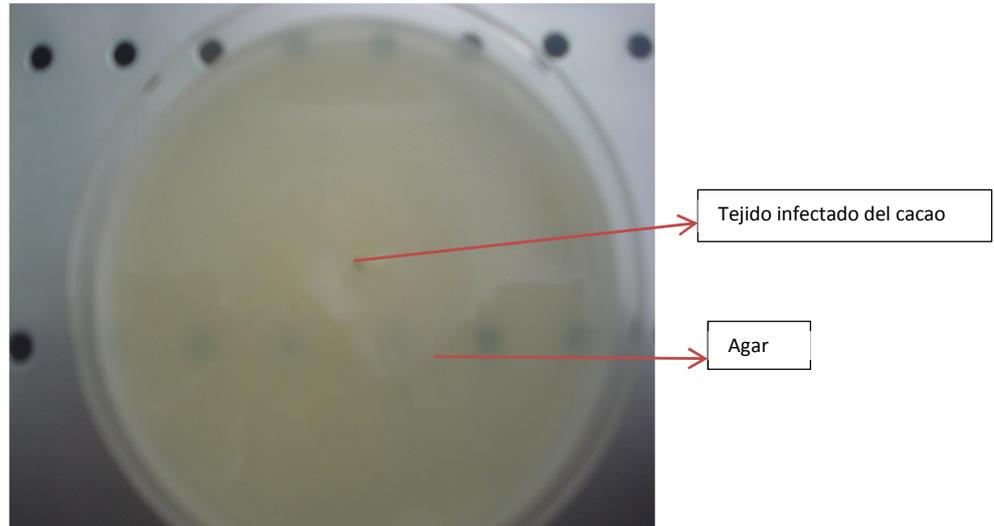
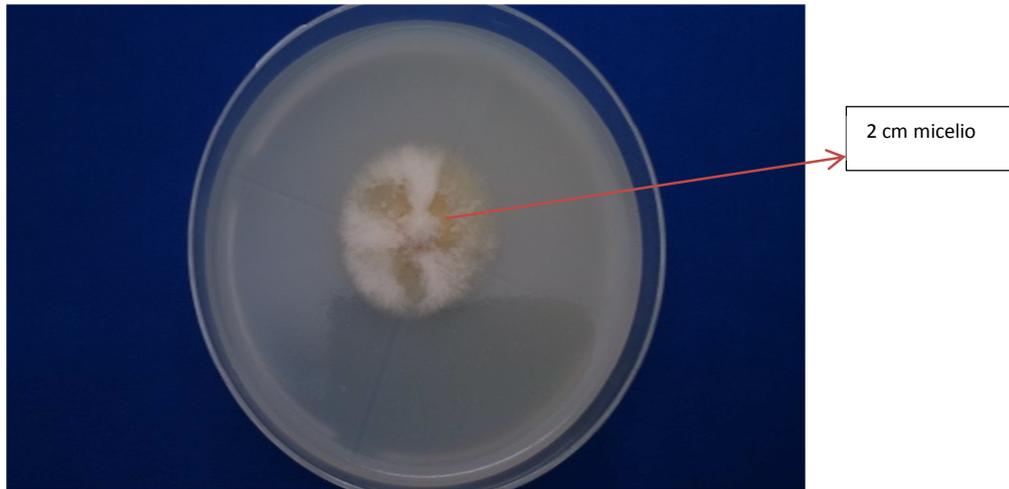


Imagen N°6 Reproducción en laboratorio del hongo (*Moniliophthora roreri*)

Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015.



Imágenes N° 7 Reproducción en laboratorio del hongo (*Moniliophthora roreri*)

Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015.

En la imagen N° 7 Se puede observar de como el hongo de la monilla (*Moniliophthora roreri*) va reproduciéndose en el medio de cultivo realizado en agar de papa dextrosa, presentando un crecimiento de 2 cm de diámetro de la colonia a las 24 horas después de haber realizado la siembra, se puede observar una mancha de color café con poca presencia de un micelio de color blanquecino.

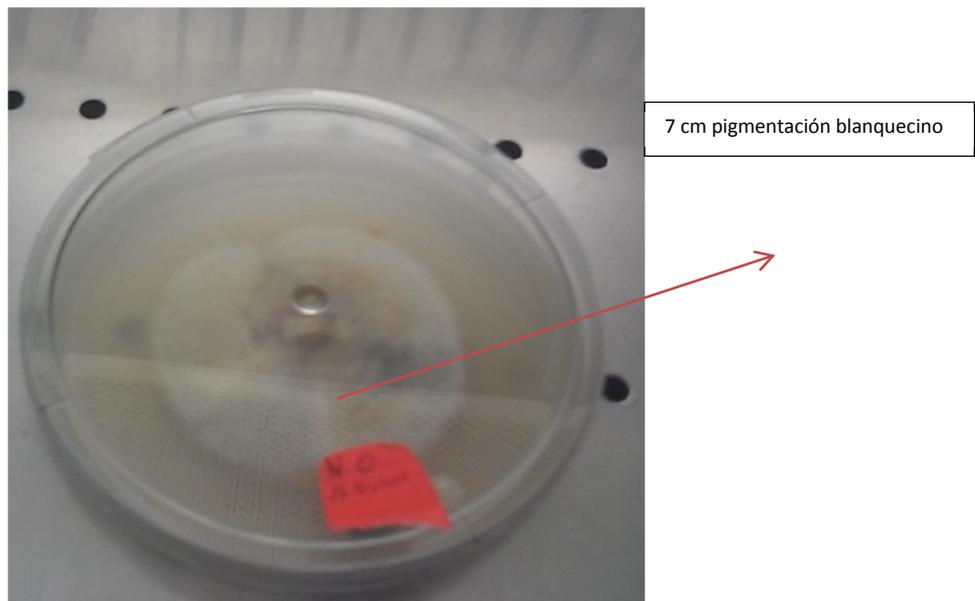


Imágenes N° 8 Reproducción en laboratorio del hongo (*Moniliophthora roreri*)

Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015.

Mientras que en la imagen N° 8 corroborando con lo dicho ENRÍQUEZ, .G 2004 se puede observar la presencia de conidióforos hialinos de forma septadas de tamaño 20 μm en colonias de crecimiento sin presencia de conidios.

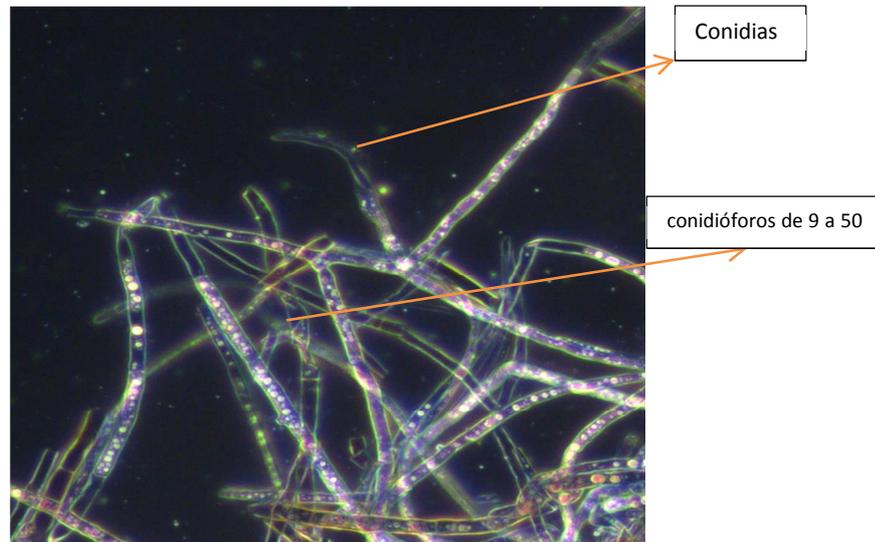


Imágenes N °9 Reproducción en laboratorio del hongo (*Moniliophthora roreri*)

Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015.

Posteriormente a las 48 horas en las imágenes N° 9 se puede identificar que el diámetro de la colonia (*Moniliophthora roreri*) creció 7 cm de diámetro, donde se observó la presencia de una pigmentación de color blanquecino.



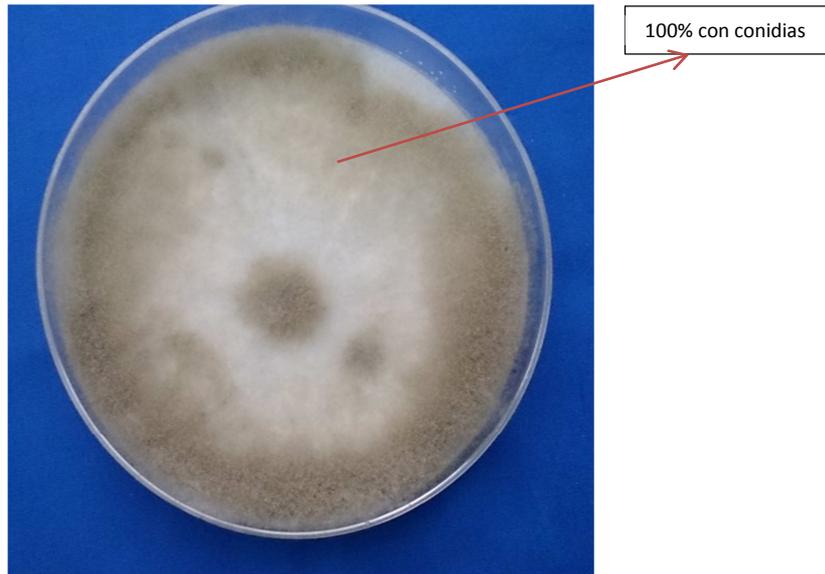
Imágenes N° 10 Reproducción en laboratorio del hongo (*Moniliophthora roreri*)

Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015.

En la imagen N° 10 se puede observar conidióforos hialinos simple o ramificado, mide 9-50 μm de largo con presencia de conidios de forma elipsoidal.

Corroborando lo observado ENRIQUEZ, 2004 afirman que Los conidióforos de (*Moniliophthora roreri*) hialinos, simples o ramificados; frecuentemente no erectos, bifurcados en su parte distal y con una ligera constricción en la septa que lo separa del resto de la hifa de origen. Se forman especialmente en el frente de avance de la colonia; miden de 9 a 50 μm de longitud aproximadamente.

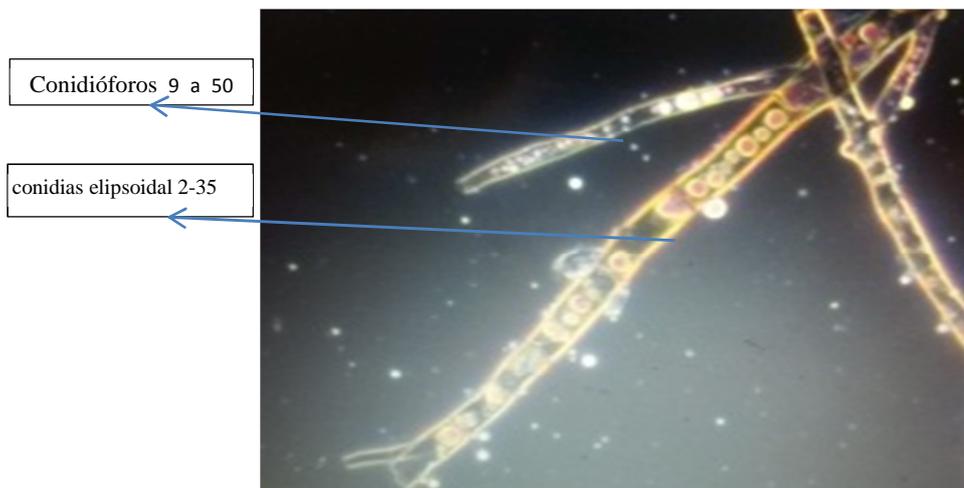


Imágenes N °11 Reproducción en laboratorio del hongo (*Moniliophthora roreri*)

Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015. Aumento: 400X

Al tercer día de haber puesto a reproducir al hongo (*Moniliophthora roreri*) en la imagen N° 11 se observó que la pigmentación de color blanquecina se torna gris con aspecto pulvulento por la presencia de esporas.



Imágenes N°12 Reproducción en laboratorio del hongo (*Moniliophthora roreri*)

Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015. Aumento: 400x

Mientras que en la imagen N° 12 se observó conidióforos hialinos simples y ramificado, con una gran cantidad de conidias de forma elipsoidal en cadena de 3 a 25 conidias.

Corroborando lo observado ENRIQUEZ, 2004 afirma, que los conidióforos son hialinos, simples o ramificados con presencia de Conidias de forma globosa hasta elipsoide. Se traducen en cadenas de longitud variable, desde 2 ó 3 conidias, hasta 35 o más. Su maduración se produce, aparentemente de forma bisípeta. Las conidias jóvenes o de reciente separación de la cadena presentan vestigios de la pared celular de origen.



Imágenes N° 13 Reproducción en laboratorio del hongo (*Moniliophthora roreri*)

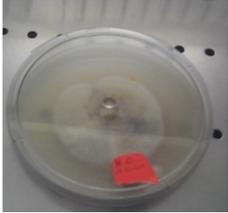
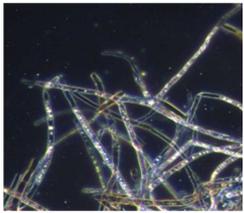
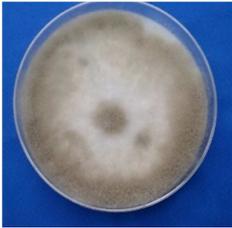
Fuente Directa

Elaborado por: OÑA, Nancy, 2015.

Aumento: 400X

Culminando el ciclo de vida de hongo (*Moniliophthora roreri*) En microscopio se observó hifas hialinas septadas y conidias catenuladas ovoides dentro y fuera del conidióforo. Corroborando lo observado ENRIQUEZ, 2004 afirma, lo que en el microscopio tridimensional se observó, hifas hialinas septadas y conidias catenuladas ovoides o redondos presentes en el conidióforo. Conidias de 2-3 hasta 35 o

**Ciclo de vida del hongo
monilia(*Moniliophthora roreri*)**

Actividad	Tiempo/T°	Imagen	Observación microscópicas	Aumento
Inoculación del hongo	En 10 minutos de 23 a 24° c			400X
Presencia de micelio	En 24 horas a T° de 24 C°			400X
formación de conidióforos	A las 48 horas a T° de 24 C°			400X
conidióforos con presencia de conidias	Al tercer día a una T° de 24C°			400X

3.4.1 Descripción del ciclo de vida del patógeno

La sobrevivencia del patógeno empieza en los residuos de cosecha (mazorcas contaminadas). Luego, las conidias son diseminadas por el viento y la lluvia, ocurriendo también contaminación de frutos o mazorcas con moniliasis de una plantación a otra. Además, debido al movimiento producido por las labores de cosecha las esporas se movilizan en el aire y bajo condiciones propicias de humedad y temperatura. (Navarro y Mendoza, 2006).

3.4.2 Epidemiología

Esta enfermedad ha sido relatada a una altitud entre 0 y 1520 m.s.n.m., donde existe precipitación fluvial anual de 780 - 5,500 mm y una temperatura de 18 a 28 °C, existe una estrecha relación entre la humedad relativa y el movimiento de esporas del hongo, indicando que la liberación es realizada entre el 71 y 74% de humedad relativa, en las condiciones secas, humedad relativa baja y temperatura mayor a 26 °C favorecen la liberación y dispersión de las conidias, y las lluvias intensas y frecuentes favorecen la presencia de agua libre sobre los frutos, facilitando la germinación. (ECUACOCOA,2010).

CONCLUSIONES

- ✓ Mediante la visita y la observación realizada al sitio de la investigación, se pudo identificar al hongo que causa mayor impacto económico en el cultivo del cacao (*Theobroma cacao*) que es la Monilia causada por el hongo (*Moniliophthora roreri*).
- ✓ Mediante la observación realizada en campo se pudo constatar que los signos y síntomas característicos del hongo *Moniliophthora roreri* son: muerte total de bayas pequeñas, frutos con manchas de color café con presencia de una sustancia de color blanquecina tornándose a un polvo gris en la etapa final del hongo. Presentando similares características que han mencionado las citas bibliográficas mencionadas anteriormente.
- ✓ En la siembra realizada en el laboratorio mediante el uso del cultivo PDA papa dextrosa se observó el desarrollo del hongo *Moniliophthora roreri* con característica estructural que son: mancha aceitosa de color café, micelio algodonoso de color blanquecino y en su etapa final se tornó a un color cenizo gris.
- ✓ Utilizando los equipos de alta tecnología como el estereoscopio con el lente de 40X se pudo visualizar que las microestructuras del hongo *Moniliophthora roreri* presentaron micelio alargados de 20µm, con la presencia de conidióforos hialinos, simples de 15µm, que contienen cadenas de conidios de 2 a 3 hasta 35 de forma globosa de 4-5 µm.
- ✓ En la investigación realizada en laboratorio se pudo observar que el hongo se desarrolla normalmente en una temperatura de 22 a 24 °C .y que su ciclo de vida se cumplió a los 5 días después de haber realizado el cultivo.

- ✓ Luego de la investigación realizada se pudo elaborar una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo en estudio para dar conocer científicamente toda la estructura que tiene el hongo en las diferentes etapas durante su ciclo biológico. Para poder tratar la enfermedad y controlar de mejor manera.

RECOMENDACIONES

- ✓ Para identificar detalladamente los signos y síntomas en un cultivo es recomendable visitar el lugar y realizar un monitoreo adecuado de todo el cultivo para tomar muestras más infectadas por el hongo.

- ✓ Para poder identificar los signos y síntomas que presenta el hongo es recomendable tener manuales y libros con contenidos sobre los hongos en estudio.

- ✓ Para el buen desarrollo del ciclo biológico de un hongo es recomendable utilizar las condiciones de ambiente en laboratorio al igual que el de su entorno natural.

- ✓ Para obtener y contribuir nuevos conocimientos obtenidos se recomienda elaborar una guía didáctica con contenidos claros y detallados.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aislamiento: separación de un patógeno a partir de un hospedante y su cultivo en un medio nutritivo.

Agar: sustancia de consistencia gelatinosa que se obtiene de las algas marinas y que se utiliza para reparar medios de cultivo nutritivos en los que se estudia y cultiva a los microorganismos.

Cepa: progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro; aislado; grupo de aislados similares; una raza.

Conidio: espora asexual de un hongo formada en el extremo de un conidióforo.

Cuerpo fructífero: estructura compleja de los hongos que contienen esporas.

Espora: unidad reproductiva de los hongos que consta de una o varias células, es análoga a la semilla de las plantas verdes

Enfermedad: cualquier mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedante, que resulta de la irritación continúa por un agente patogénico

Esterilización: eliminación de los patógenos y otros organismos vivos del suelo, recipientes, etc., mediante calor o sustancias químicas.

Fitopatógenos: termino que se aplica a los microorganismos que producen enfermedades en las plantas.

Hongo: pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes.

Hifa: ramificación simple de un micelio.

Hospedante: planta que es invadida por un paracito y de la cual este obtiene sus nutrientes.

Medio de cultivo: medio nutritivo preparado en el que se cultivan microorganismos o células vegetales.

Micelio: hifa o masa de hifas que constituyen el soma de un hongo

Purificación: aislamiento y concentración de partículas virales en forma pura, libre de los componentes celulares.

Signo: patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante.

Síntoma: reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de una enfermedad o factor ambiental y que lleva al desarrollo de síntomas

Bibliografía

- AGRIOS, G. (2007). Fitopatología. México: LIMUSA. AGRIOS, G. (2005). Plant Pathology. Nueva York: Academic Press. 2009: <http://agronegociosecuador.ning.com/page/produccion-agricola-200>
- ARTICA, M. R. (2008). MONILIASIS DEL CACAO. En CULTIVO DEL CACAO. Republica de Panama: Editora macro EIRL.
- BRAUDEAU. (2008). Sanidad Vegetal Frutas Tropicales.
- CALZADA, B. (2002). Frutales nativos. Lima, Perú: El Estudiante.
- CIF. H.C. Evans, Stalpers, Samson & Benny, (1978)
- CHARLES, V. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología (Vol. 26). Medellin, Colombia: Revista "Agronomía Colombiana" de la Universidad Nacional de Colombia.
- DSPACE.ESPOL. (2014). Caracterización morfológica, fisiológica y patogénica.
- ECHANDI, (2001) laboratory guide to identification of the major species. Ferry Lane, Kew y Surrey. Inglaterra. Commonwealth Mycological Institute. 58 p
- ENRÍQUEZ, .G 2004. Cacao orgánico guía para productores ecuatorianos 11.-INIAP manual 54 QUITO ECUADOR pag.38, 41
- ECUACOCOA. 2010 "HISTORIA DEL CACAO " pag.25-32. Quito - Ecuador.
- FHIA. (2007). DISPONIBLE EN <http://fhia.org.hn/downloads/fhiainfdic2007.pdf>
- FRENCH, E., & HEBERT, T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica: IICA
- HERRERA, L., & MAYEA, S. (1994). Fitopatología General. La Habana, Cuba: Felix Varela.
- HERRERA, M. y. (1994). Fitopatología General. La Habana - Cuba: Felix Varela.
- ICA. (2013). Manejo Fitosanitario del Cultivo del Cacao.
- INAMHI. (2014). Anuario meteorológico Nro. 51-2011. Quito, Ecuador.

- 19.-INIAP. (2009). RECOMENDACIONES PARA LA TOMA DE MUESTRAS.
- INIAP. (2009). Sanidad Vegetal: Recomendaciones para la toma de muestras. Quito, Ecuador.
- LIDERES, R. (2013). DESARROLLO ECONOMICO DEL CACAO. Quito Ecuador
- LOPEZ, A. (1979). Manejo de Hongos Fitopatogenos. Mexico: Universidad Autónoma de Chapingo.
- LOPEZ, M. (1994). Horticultura. México: Trillas.
- MÓSTACEDO, B., & TODD, F. (2000). Manual de Métodos Básicos de Muestreo y Análisis en Ecología Vegetal. Santa Cruz, Bolivia.
- SINAGAP. (2015). nacional: <http://sinagap.agricultura.ec/visualizador>
- PLANTWISE. (2015) cultivo de la moniliasis disponible en: <http://www.plantwise.org>
- SORIA, D. (2012). HISTORIA DEL CACAO. ECUACOCOA. Pag.25-32. Quito - Ecuador.
- SUARES, C, DELGADO, J 1993'' Moniliasis del cacao'' FUNDAGRO Quito Ecuador
- SUARES, C, DELGADO, J 1993'' Moniliasis del cacao'' centro experimental pichilingue INIAP Quito Ecuador, Pag.5, 6,7.
- STANIER, K. (1996). Microbiología. Barcelona, España: Revert.
- STREETS, R. (1972). The diagnosis of plant disease. laboratory manual emphasizing the most practical methods for rapid identification. Tucson, Arizona.

ANEXOS



**Universidad
Técnica de
Cotopaxi**

UNIDAD ACADÉMICA DE RECURSOS AGROPECUARIOS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**GUÍA DIDÁCTICA DE LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE
Moniliophthora roreri EN EL CULTIVO DE CACAO (*Theobroma cacao*)**

Autor(a): Oña Cuyachamin Nancy jeaneth

ÍNDICE

Introducción

Fundamentación

Objetivo

Ubicación

Bloque I. Metodología

Bloque II. Resultados

Material de consulta sugerido

INTRODUCCIÓN:

En muchos sectores del Ecuador los hongos fitopatógenos son los culpables de grandes pérdidas económicas al dañar los cultivos, el sector Los Laureles del Canton La Mana no es la excepción al tener muchos problemas en el cultivo de cacao causado por el hongo, *Moniliophthora roreri* más conocido en la zona por sus agricultores como moniliasis, por lo cual en la presente Guía Didáctica se redactan los pasos más prácticos para la reproducción de dicho hongo en condiciones de laboratorio, con el objetivo de aislar, propagar y estudiar el fitopatógeno para poder a futuro recomendar un control adecuado, teniendo ya muy claro el ciclo de vida, y la morfología del patógeno.

FUNDAMENTACIÓN:

El cacao es una fruta tropical, sus cultivos se encuentran mayormente en el Litoral y en la Amazonía. Es un árbol con flores pequeñas que se observan en las ramas y producen una mazorca que contiene granos cubiertos de una pulpa rica en azúcar. La producción de cacao se concentra principalmente en las provincias de Los Ríos, Guayas, Manabí y Sucumbíos. En el país se cultivan dos tipos de cacao: el Cacao CCN-51 y el denominado Cacao Nacional. Es un Cacao Fino de Aroma conocido como 'Arriba', desde la época colonial. Ecuador es el país con la mayor participación en este segmento del mercado mundial (un 63% de acuerdo con las estadísticas de (Pro Ecuador). Otro dato muy importante es que en el 2011, Ecuador recibió el premio como "mejor cacao por su calidad oral" y "mejor grano de cacao por región geográfica" en Salón du Chocolat en París, Francia. (LIDERES ,2013).

La evolución del cultivo en la costa ecuatoriana, Según fuentes históricas, desde principios de 1600 ya habían pequeñas plantaciones de cacao a orillas del río Guayas y se expandieron a orillas de sus afluentes el Daule y el Babahoyo, ríos arriba, lo cual

originó el nombre de cacao "Arriba" en el mercado internacional, que va ligado a su denominación de origen. La variedad que da origen a este cacao se denomina nacional y botánicamente pertenece a los denominados forasteros amazónicos. La variedad nacional, productora del cacao arriba y reconocido mundialmente por su aroma floral, es producido exclusivamente por Ecuador. (ECUACOCOA, 2010).

En muchos sectores del Ecuador los hongos fitopatógenos son los culpables de grandes pérdidas económicas al dañar los cultivos, el sector Los Laureles del Canton La Mana no es la excepción al tener muchos problemas en el cultivo de cacao causado por el hongo, *Moniliophthora roreri* más conocido en la zona por sus agricultores como moniliasis, por lo cual en la presente Guía Didáctica se redactan los pasos más prácticos para la reproducción de dicho hongo en condiciones de laboratorio, con el objetivo de aislar, propagar y estudiar el fitopatógeno para poder a futuro recomendar un control adecuado, teniendo ya muy claro el ciclo de vida, y la morfología del patógeno.

OBJETIVO:

La presente guía didáctica sobre la caracterización morfológica del hongo, *Moniliophthora roreri* cuya finalidad es complementar los conocimientos y fomentar el autoaprendizaje en el aula.

UBICACIÓN:

Tabla 1. Ubicación del laboratorio.

Sitio:	Salache Bajo
Parroquia:	Eloy Alfaro
Cantón:	Latacunga
Provincia:	Cotopaxi
Coordenadas cuadrícula mercator utm:	N: 9888.749,37. E: 764.660,386.

Altitud:	2757,59 msnm.
-----------------	---------------

Fuente: Autoría pr

BLOQUE I. METODOLOGÍA:

Tabla 2. Recolección de la muestra en campo y tratamiento en laboratorio.

	<p>En cultivos de cacao (<i>Theobroma cacao</i>) ubicados en el sector Los Laureles del Cantón la Mana de la Provincia de Cotopaxi, a una altura de 586 m.s.n.m con T° de 23 C° y HR de 92%, se tomó muestras de frutos que presentaban signos y síntomas de estar afectados por <i>Moniliophthora roreri</i></p>
	<p>Utilizando protocolos de recolección de material en campo se recolecto frutos enfermos, luego fueron almacenados en fundas tetrapac para ser transportados hacia el laboratorio en un rango de tiempo de 4 horas en vehículo.</p>
	<p>En un refrigerador a una temperatura entre 6 y 8°C fueron almacenadas las muestras tomadas en campo en las fundas de tetrapac, esto con la finalidad de que el patógeno se mantenga vivo.</p>

	<p>Las muestras al etiquetarlas deben estar bien rotuladas para evitar que se mezclen, tomando en cuenta que el tiempo de almacenado no sea mayor a 8 días.</p>
---	---

Fuente: Autoría propia

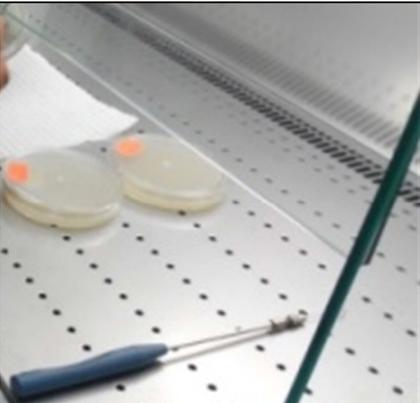
Tabla 3. Preparación del medio de cultivo, papa - dextrosa - agar (PDA),

	<p>Primero.- se peso 200 gr. de papa pelada y se corto en cuadritos, poner en una olla para cocerlos por 10 minutos con 500 ml de agua con un pH de 6.5 el mismo que se bajo con ácido cítrico, para evitar la propagación de bacterias.</p>
	<p>Segundo.- pasamos por el colador la sustancia obtenida para liberarla de impurezas, la regresamos a fuego lento completando con agua lo que se evaporo, procedimos a añadir 15 gr. de agar, 20 gr. de dextrosa y 2 gr. de levadura.</p>
	<p>Tercero.- una vez que se obtuvo una solución homogénea procedimos a trasladarla a un Erlenmeyer lo tapamos bien con papel aluminio para evitar que se derrame y lo sometemos a 35 min en el autoclave para esterilizarlo.</p>

	<p>Cuarto.- una vez que obtuvimos el medio de cultivo esterilizado procedimos a ponerlo en cada caja Petri con mucho cuidado para evitar contaminaciones, fue necesario esperar de 5 a 10 minutos para que se gelatinice.</p>
---	--

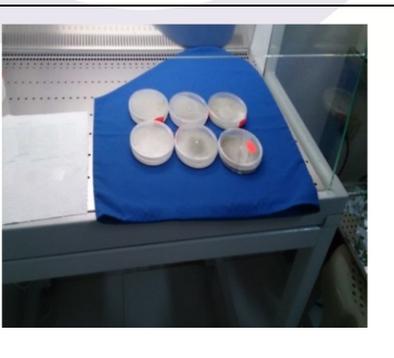
Fuente: Autoría propia

Tabla 4. Siembra y cultivo del hongo

	<p>Las cajas Petri con el medio de cultivo PDA fueron trasladadas a la cámara de flujo laminar al igual que las muestras para ahí realizar la siembra, la inoculación en la cámara de flujo laminar es para evitar la contaminación del medio de cultivo.</p>
	<p>Las cajas Petri ya sembradas las colocamos en la incubadora a una temperatura de 22°C para que el hongo se propague de manera más rápida.</p>
	<p>En el transcurso de esta etapa se tuvo que estar pendientes de las muestras observándolas cada día y siendo muy minuciosos con todo lo que suceda en las cajas, diferenciando las colonias de hongos y bacterias .</p>

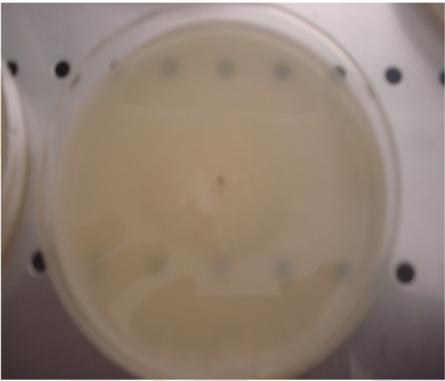
Fuente: Autoría propia

Tabla 5. Identificación y Aislamiento

	<p>Se llevó las cajas Petri a la cámara de flujo laminar en donde se abrió para tomar muestras en el porta objetos, la mejor manera de coger las muestras fue con un pedacito de cita adhesiva transparente.</p>
	<p>Observamos al microscopios para poder diferenciar las estructuras de los diferentes hongos que se propagaron en la caja hasta encontrar a la <i>Moniliophthora roreri</i> utilizando los lentes de 20x y 100x.</p>
	<p>Se diferencia la caja Petri que contenga, <i>Moniliophthora roreri</i> Preparamos nuevamente medio de cultivo PDA, llevamos a la cámara de flujo laminar para volver a sembrar.</p>
	<p>Ya todo en la cámara de flujo laminar se obtiene una porción de micelio y se lo siembra en la caja Petri con el medio de cultivo, la llevamos a la incubadora y continuamos con las observaciones.</p>

Fuente: Autoría propia

Tabla 6. Caracterización Morfológica

 A photograph of a Petri dish containing a light-colored agar medium. The dish is placed on a white surface, and the agar appears slightly moist and uniform in color.	<p>Como ya tuvimos la caja Petri con <i>Moniliophthora roreri</i> completamente libre de contaminación se pudo coger la muestra para llevarla al microscopio y observarla con los lentes de 20 x y 100x ya que estos son los de mayor aumento y pudimos diferenciar de mejor manera sus estructuras.</p>
 A photograph of a Petri dish with a dark blue background. The agar medium is clear, and a distinct, circular, white mold colony is visible in the center. The colony has a slightly fuzzy, cottony appearance.	<p>Una vez que ya tuvimos enfocado en el microscopio procedimos a tomar las fotografías con el programa INFINITI fue la manera más adecuada de obtener fotografía claras.</p> <p>En las fotografías que obtuvimos se procedió a identificar las partes del hongo que pudimos diferenciar y lo comparamos con la bibliografía existente.</p>

Fuente: Autoría propia

BLOQUE II. RESULTADOS:

Micelio observado al Microscopio Trinocular CX31

En la Imagen 1 se puede apreciar el micelio de la *Moniliophthora roreri* Obtenido en laboratorio en medio de cultivo PDA.

La imagen fue obtenida con ayuda de un microscopio con el lente de 40 x, en campo oscuro Ph2 y con intensidad de luz de 5.



IMAGEN 1. A. micelio de la *Moniliophthora roreri*

Tomada por: El Investigador

El hongo inicialmente presento micelio algodonoso de color blanco, sinuosas, ramificadas e inicialmente intercelulares. A partir de estas forma “hifas efectivas” de 1 a 20 μm , con las cuales penetra a las células. Externamente es filamentoso, formado por

filamentos muy finos enmarañados, con aspecto lanoso, extendidos sobre el sustrato, tal como se obtuvo en laboratorio y se ratifica con lo dicho por (ENRÍQUEZ, 2004).

En la Imagen 2 se puede apreciar los conidióforos de la *Moniliophthora roreri* Obtenido en laboratorio en medio de cultivo PDA.

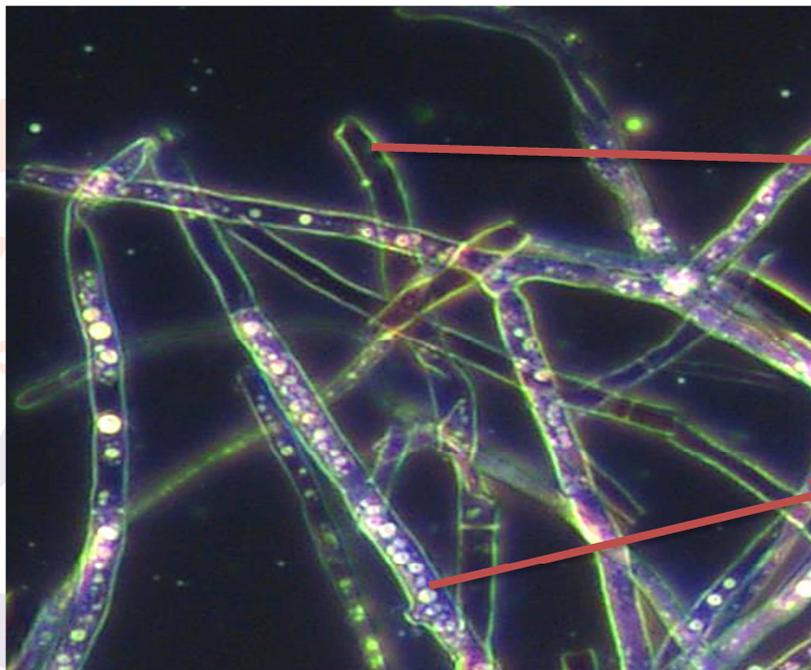


IMAGEN 2. A. Conidioforo. B. Conidias

Tomada por: El Investigador

En la imagen N° 2 se puede observar conidióforos hialinos simple o ramificado, mide 9-50 μm de largo con presencia de conidios de forma elipsoidal.

Corroborando lo observado ENRIQUEZ, 2004 afirman que Los conidióforos de (*Moniliophthora roreri*) hialinos, simples o ramificados; frecuentemente no erectos, bifurcados en su parte distal y con una ligera constricción en la septa que lo separa del resto de la hifa de origen. Se forman especialmente en el frente de avance de la colonia; miden de 9 a 50 μm

Conidias observadas al Microscopio Trinocular CX31

En la Imagen 3 se puede apreciar las conidias de la (*Moniliophthora roreri*) Obtenido en laboratorio en medio de cultivo PDA.

La imagen fue obtenida con ayuda de un microscopio con el lente de 40x

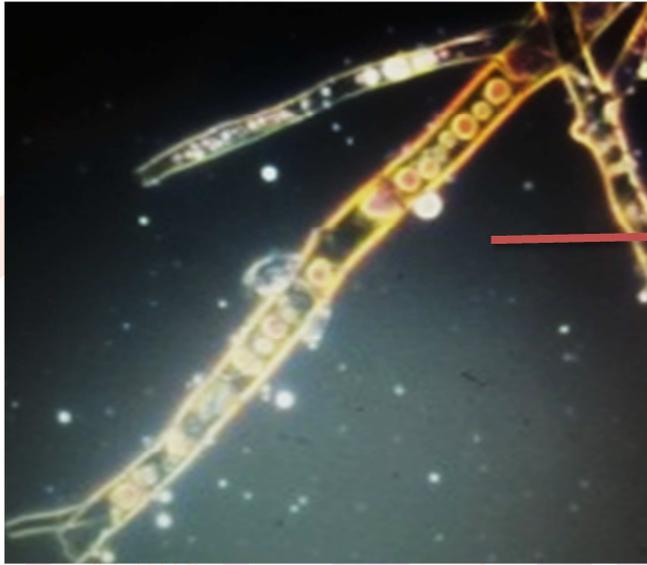


IMAGEN 3. A Conidias de la (*Moniliophthora roreri*)

Tomada por: El Investigador

Mientras que en la imagen N° 3 se observó conidióforos hialinos simples y ramificado, con una gran cantidad de conidias de forma elipsoidal en cadena de 3 a 25 conidias.

Corroborando lo observado ENRIQUEZ, 2004 afirma, los conidióforos son hialinos, simples o ramificados con presencia de Conidias de forma globosa hasta elipsoide. Se traducen en cadenas de longitud variable, desde 2 ó 3 conidias, hasta 35 o más. Su maduración se produce, aparentemente de forma bisípeta.

Reproducción observada al Microscopio Trinocular CX31

En la Imagen 4 se puede apreciar los órganos de reproducción de la (*Moniliophthora roreri*) Obtenido en laboratorio en medio de cultivo PDA.



IMAGEN 4. A. conidioforo. B. Conidias.

Tomada por: El Investigador

Culminando el ciclo de vida de hongo (*Moniliophthora roreri*) En microscopio se observó hifas hialinas septadas y conidias catenuladas ovoides dentro y fuera del conidióforo.

Corroborando lo observado ENRIQUEZ, 2004 afirma, En microscopio se observaron hifas hialinas septadas y conidias catenuladas ovoides o redondos presentes en el conidióforo. Conidias de 2-3 hasta 35 o más

MATERIAL DE CONSULTA SUGERIDO:

ENRÍQUEZ, .G 2004. Cacao orgánico guía para productores ecuatorianos INIAP manual 54 QUITO ECUADOR pag.38, 41.'

SUARES, C, DELGADO, J 1993'' Moniliasis del cacao'' FUNDAGRO Quito Ecuador.

ARTICA, M. R. (2008). MONILIASIS DEL CACAO. En *CULTIVO DEL CACAO*. Republica de Panama: Editora macro EIRL.

ANEXO: 2

ENFERMEDADES DEL CACAO

Enfermedad	Signos y síntomas	Imágenes de signos y síntomas.
<p>Mal de Machete</p>	<p>Es causado por hongos que pueden matar al árbol de cacao y que se asocia con el barrenador del tronco que infecta los sistemas internos de la planta provocando su muerte, observándose que las hojas se secan y quedan pegadas en el árbol</p>	
<p>Phytophthora</p>	<p>Afecta a todas las partes de la planta de cacao, frutos, raíces, tronco; el hongo vive en el suelo y es favorecido por la alta humedad del suelo y ambiente, el daño más grave lo ocasionan en las mazorcas, que al abrirlas se percibe un olor a pescado de mar</p>	
<p>Escoba De Bruja</p>	<p>Infectan a los puntos de crecimiento de la planta; ocasionando deformaciones en hojas, ramas, cojinetes florales y frutos, es ocasionado por un hongo cuya presencia se da en fincas con exceso de material vegetativo, ocasionando el hinchamiento de los brotes y las mazorcas afectadas toman la forma de zanahorias o chirimoyas.</p>	

ANEXO: 3 En Campo

Visita al sitio de recolección de muestras.



Foto: 1 Identificación de la enfermedad



foto: 2 mazorcas infectadas



Foto: 3 Fruto con moniliasis en su etapa final



Fotos: 4 pepinos con moniliasis



Foto: 5 Síntomas de la moniliasis



Foto: 6 identificaciones de muestras

ANEXO 4: Equipos de laboratorio



Foto: 7 Incubadora



Foto: 8 Cámara de flujo laminar



Foto:9 Autoclave



Foto:10 Estereoscopio



Foto: 11 Microondas y

Destilador de agua



Foto: 12 Cocina eléctrica

ANEXO 5: Pasos realizados en la caracterización morfológica de hongo (*Moniliophthora roreri*).

Preparación del agar papa destroxa



Foto:13 Limpieza y cocion de papas 350 gr



Foto:14 se utilizo 30 gr agar



Foto:15 35 gr. de glucosa



Foto:16 3,5 de levadura



Foto.17 Mezcla la preparacion por 2 minutos
hora



Foto:18 Desifección del agar por 1

ANEXO 6: Identificación de macro y microestructuras

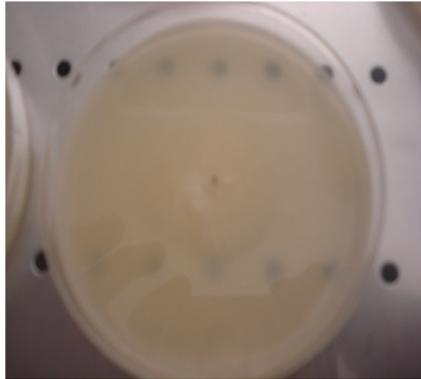


Foto: 19 Tejido infectado en medio de cultivo



Foto: 20 Toma de muestras para su identificación

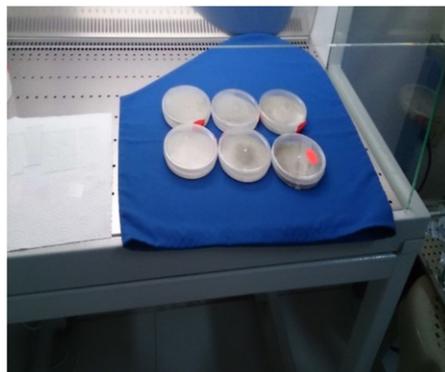


Foto: 21 Medios de cultivo



Foto.22 Identificación del hongo

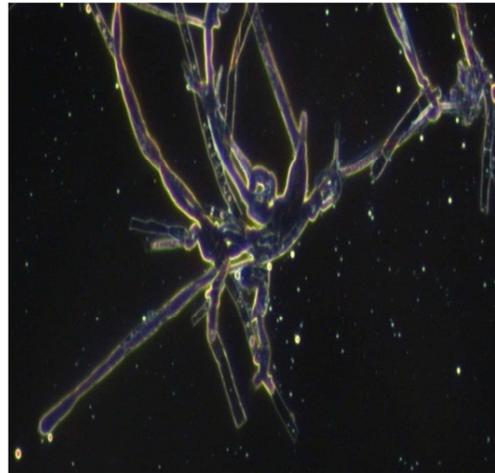


Foto: 23 Microestructura (*Moniliophthora roreri*).

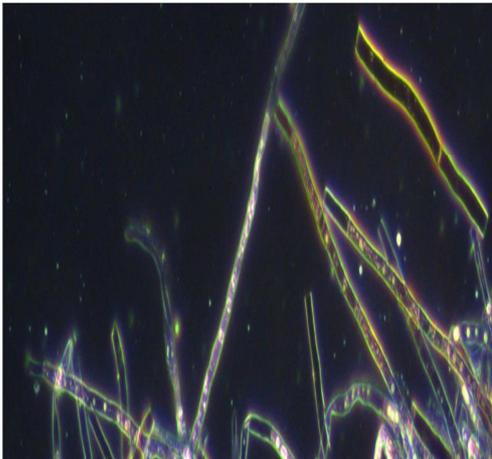


Foto: 24 Microestructura observada con el lente 40X
(*Moniliophthora roreri*).

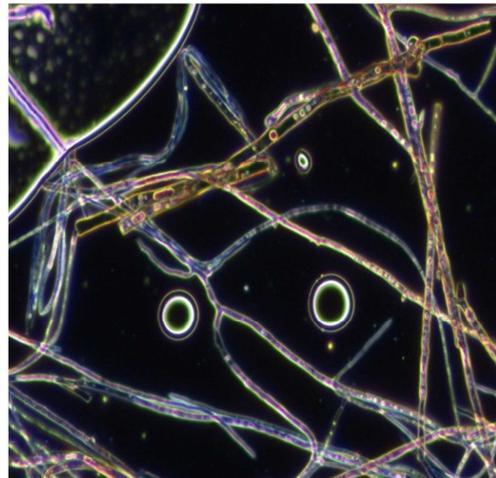


Foto: 25 Microestructura observada con el lente 40X
(*Moniliophthora roreri*).

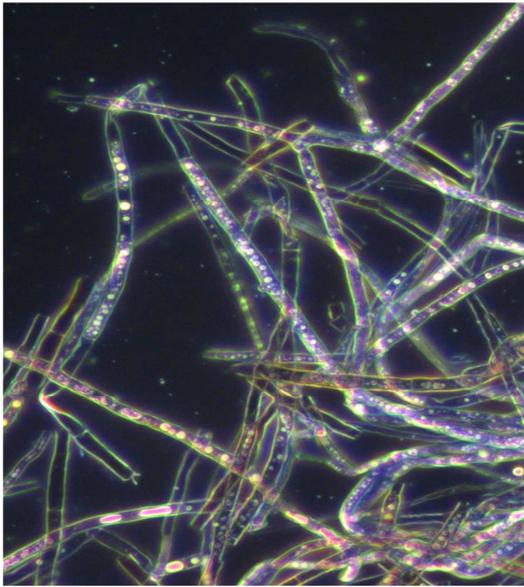


Foto: 26 Microestructura observada con el lente 40X
(*Moniliophthor aroreri*).

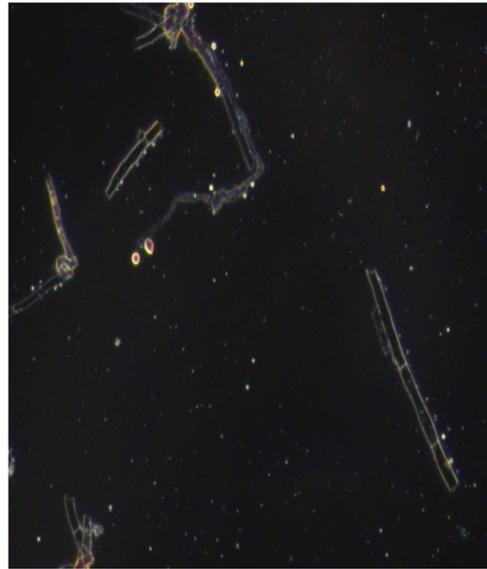


Foto: 27 Microestructura observada con el lente 40X
(*Moniliophthora roreri*).

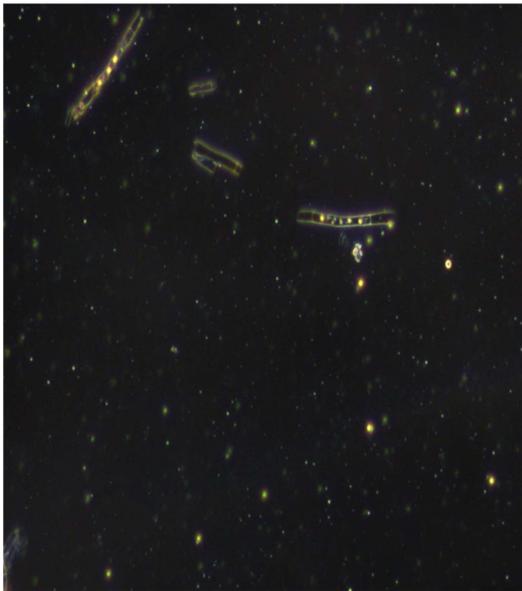


Foto.28 Microestructura observada con el lente 40X
(*Moniliophthora roreri*).



Foto: 29 Microestructura observada con el lente 40X
(*Moniliophthora roreri*).